

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Regeneración e inmunomodulación en células madre mesenquimales
de pacientes artrósicos: estudio genético y funcional**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Esther Villafuertes Alonso

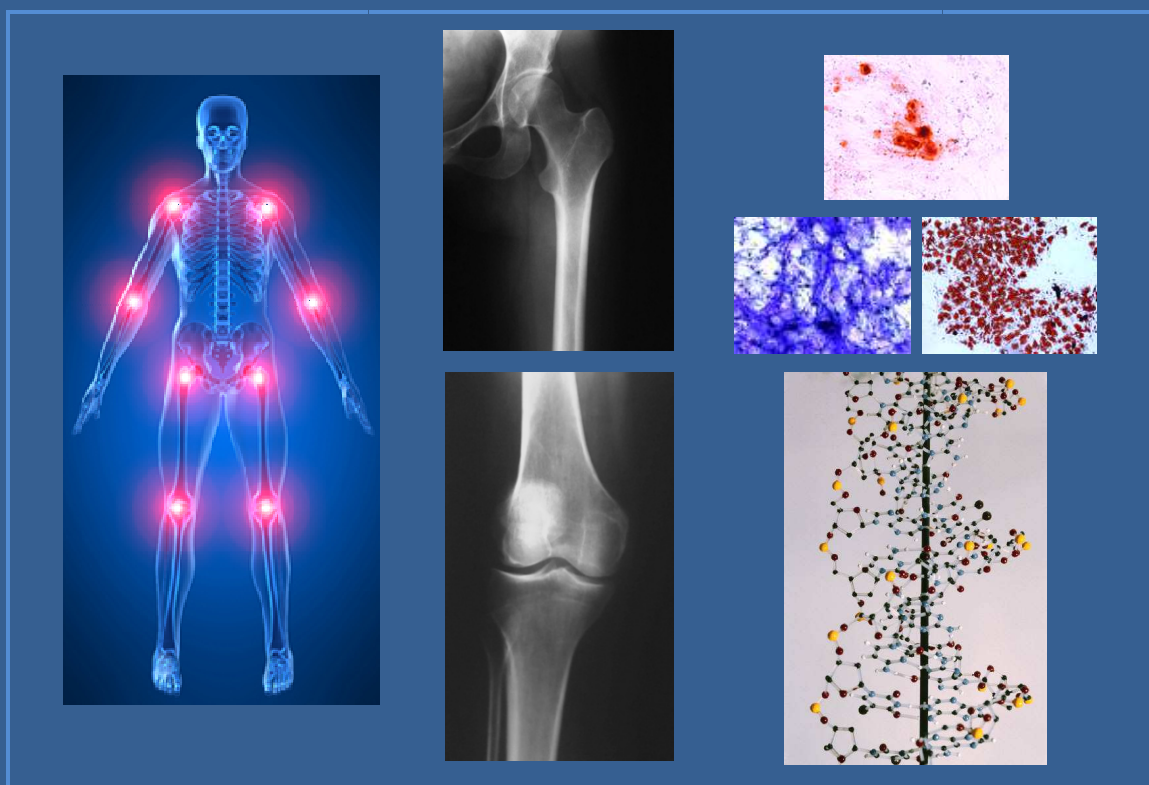
Directores

Benjamín Fernández Gutiérrez
José Ramón Lamas López

Madrid, 2014



REGENERACIÓN E INMUNOMODULACIÓN EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PACIENTES ARTRÓSICOS. ESTUDIO GENÉTICO Y FUNCIONAL



Esther Villafuertes Alonso

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Complutense de Madrid

Es intentando lo imposible como se realiza lo posible.

Henri Barbusse (1873-1935)

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

A mis directores de tesis: el Dr. Benjamín Fernández Gutiérrez, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y por tanto de iniciar mi formación científica y al Dr. José Ramón Lamas López, por sus enseñanzas, sus consejos y su ejemplo.

Al Dr. Fernando Marco Martínez, por su inestimable colaboración y su apoyo.

Al servicio de Reumatología del Hospital Clínico, empezando por mis compañeros de laboratorio, tanto los que están como los que se han ido.

Al servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Clínico por su paciencia y su ayuda desinteresada.

Al servicio de Inmunología del Hospital Clínico por su gran colaboración.

Al servicio de Reumatología del Erasmus MC de Rotterdam, por su amable acogida, ayuda científica y técnica. En especial quisiera agradecer su implicación en este trabajo a la Dra. Gerjo Van Osch. Gracias Gerjo, Gerben, Wendy, Nicole y Mirthe.

A la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Clínico, muchas gracias por vuestra amistad, con vosotros he pasado los mejores momentos trabajando:

Pablo, muchas gracias por tu guía a lo largo de estos años en el Hospital. Lourdes, muchas gracias por tu ánimo incansable y positividad. Cruz, amiga y confidente leal, gracias por ser tú cada día. Jorge, gracias por hacernos reír cada día. Carol, tu inocencia me da esperanza. Irene, compañera, sin ti no hubiera sido posible. Ascen, eres el artífice de este trabajo. Maite, gracias por ser la brisa cuando me ahogaba. Raquel, gracias por aportar la calma cuando todo parece perdido. Lola, tu buen humor nos anima a todos. Maribel, con tu ayuda todo fue siempre más fácil. Marisol, siempre dispuesta a echar una mano. Amanda, siempre paciente.

A mis amigos: Miguel, Andrés, Virginia, Pili, Gabi, Patri S., Juanma, Vero, Patri P., Bea, Julio, Dani y Álvaro, gracias a vosotros he sobrellevado los malos momentos con una sonrisa y salud mental. Gracias por estar ahí.

A mi familia: Petri, Simón, Irene, gracias por apoyarme y preocuparos por mí. Sara y la pequeña Sofía, gracias por tu amistad e inculcarme el interés por el inglés, siempre recordaré nuestros viajes. Chache, si hay una tesis escrita en las páginas siguientes es porque siempre he seguido los pasos de mi hermano

mayor. Papá y mamá desde muy pequeña me enseñasteis que las cosas cuestan esfuerzo y sois un ejemplo a seguir, siempre luchando y sobreponiéndose a las circunstancias, gracias.

Y por último, gracias Óscar, aunque todos me han aguantado, tú te has llevado la peor parte y aún así no te has separado nunca de mi lado, siempre me has animado y has calmado a mis demonios. Sin tu paciencia, perseverancia y amor estaría perdida. Muchas gracias, eres mi vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
THESIS SUMMARY	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN.....	11
1. La artrosis	13
1.1. Criterios de diagnóstico de la artrosis	14
1.2. Clasificación y estructura de la articulación.....	14
1.2.1. El cartílago articular	15
1.2.2. El hueso subcondral	16
1.2.3. La membrana sinovial	17
1.3. Origen y mecanismos asociados a la artrosis	18
1.3.1. Mecanismos asociados a la artrosis.....	19
1.4. Tratamiento de la artrosis	22
2. Las células madre mesenquimales (CMMs)	24
2.1. Origen y fenotipo de las CMMs	25
2.2. CMMs en la medicina regenerativa.....	26
2.3. CMMs en inmunomodulación.....	27
2.4. Tratamiento de la artrosis con CMMs	29
2.5. Vías de administración de las CMMs.....	29
2.5.1. Matrices utilizadas para la administración de CMMs	30
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	37
Objetivo global	39
Objetivos específicos	39
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. Diseño experimental y sujetos de estudio	43
2. Pacientes artrósicos	44
2.1. Selección de pacientes artrósicos	44
2.2. Sujetos control.....	45
2.3. Datos epidemiológicos	46
3. Obtención de las CMMs de MO	47

3.1.	Obtención de MO	47
3.2.	Aislamiento de las CMMs de MO.....	47
3.3.	Caracterización de las CMMs de MO	48
3.3.1.	Citometría de flujo	48
3.3.2.	Ensayos de diferenciación a linajes mesodérmicos.....	48
4.	Preparación de las esferas de alginato.....	50
5.	Ensayos de inmunomodulación.....	50
6.	Ensayo de supervivencia celular en alginato medida en cantidad de ADN	51
7.	Obtención de las muestras de sangre y suero.....	51
7.1.	Extracción de sangre	51
7.2.	Obtención de suero.....	51
8.	Extracción de ARN y transcripción inversa (RT)	52
8.1.	Extracción de ARN	52
8.2.	RT de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
9.	Aislamiento de ADN.....	53
10.	DNA microarray.....	53
10.1.	Hibridación.....	53
10.2.	Obtención de datos	54
10.3.	Análisis de datos e imágenes.....	54
11.	Genotipado de SNPs mediante sondas Taqman	55
11.1.	COL10A1	55
11.2.	IGF1	56
12.	PCR cuantitativa a tiempo real del ADNc.....	56
12.1.	RT-PCR COL10A1	56
12.2.	Estudio de inmunomodulación.....	57
13.	Ensayo de inmunabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	57
13.1.	ELISA de IGF1	57
13.2.	ELISA de IL6 y TIMP2	58
14.	Ensayo de cuantificación de IDO.....	58
15.	Análisis estadístico.....	59
RESULTADOS		61
1.	Caracterización de los sujetos de estudio	63
2.	Caracterización de las CMMs de la MO y estudio de los marcadores de superficie. .	64

2.1.	Marcadores de superficie de las CMMs	65
2.2.	Ensayos de diferenciación	66
3.	Comparación del perfil de expresión génica de las CMMs.....	67
3.1	Análisis de GO	69
3.2	GSEA	70
3.2.1	GSEA de genes de colágeno	73
3.2.2	GSEA de genes de IGF1	74
3.2.3	GSEA de genes de apoptosis (ruta de las caspasas)	75
3.2.4	GSEA de genes de respuesta inflamatoria	76
3.2.5	GSEA de genes de respuesta inmune	77
3.2.6	GSEA de genes implicados en la regulación del crecimiento celular	79
3.3	Asociaciones genéticas encontradas con artrosis	80
3.3.1	Asociaciones genéticas del polimorfismo del COL10A1 con artrosis	80
3.3.2	Asociaciones genéticas del polimorfismo del IGF1 con artrosis	81
3.4	Validación de los resultados obtenidos mediante GSEA	82
3.4.1	Validación de los resultados del juego génico de colágeno: COL10A1	82
3.4.2	Validación de los resultados del juego génico de IGF1	83
4.	Aproximación terapéutica: uso de CMMs en terapias celulares de inmunomodulación	84
4.1.	Propiedades inmunomoduladoras de las CMMs artrósicas: Expresión génica ...	84
4.2.	Propiedades inmunomoduladoras de las CMMs de pacientes artrósicos: Análisis de los factores secretados	87
4.3.	Capacidad de diferenciación de las CMMs artrósicas embebidas en alginato	89
	DISCUSIÓN	91
	CONCLUSIONES	103
	BIBLIOGRAFÍA	107

REGENERATION AND IMMUNOMODULATION IN MESENCHYMAL STEM CELLS FROM OSTEOARTHRITIS PATIENTS. GENETIC AND FUNCTIONAL STUDY

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent form of arthritis. This musculoskeletal disorder is caused by an imbalance between catabolic and anabolic factors, which leads to articular cartilage loss, sinovial inflammation and subchondral bone changes.

OA is a complex and multifactorial disease. Aging, metabolic disorders, articular damages or genetic mutations are found among its risk factors.

Up to date, there is not effective drug treatment for OA, beyond a pain relief. Anyway, the regeneration of tissues from the damaged joint is not achieved. In this context, the application of mesenchymal stem cells (MSCs) could be hopeful.

MSCs are cells with self-renewal and multilineage differentiation potential. Under proper conditions, MSCs can give rise to chondrocytes, adipocytes, osteoblasts, and other cells of mesodermic lineage. Furthermore, it has been shown that MSCs are capable of modulating the immune response and participate in the healing process by secreting various soluble factors.

MSCs are easily isolated from bone marrow, but are also present in other tissues such as adipose tissues. Thus, their use has been pointed toward cell regenerative therapies, even more when their low or absent immunogenicity is considered, as they do not express class II molecules.

Nevertheless, the MSCs aimed to tissue regeneration or immunomodulation could present genetic or molecular damages, counteracting their properties. The study of these defects may enlighten the physiopathology of the disease and the therapeutic use of MSCs in this disorder type.

OBJETIVES

The main goal of this study was the comparison between bone marrow MSCs from OA patients and from subcapital fracture patients, considered as control group.

Aiming to determine the suitability of MSCs in cell therapies, we analyzed the gene expression profile from both groups of patients, the susceptibility to develop OA by a single nucleotide polymorphism (SNP) study, and also, we determinate the effect of matrix on MSCs' characteristics.

MATERIAL AND METHODS

In this study a DNA microarray was used to comparatively describe the transcriptional differences between MSCs, obtained from osteoarthritic patients, and those from non-OA donors.

To ensure the purity and properties of MSCs from both types of donors, we characterized the cells by flow cytometry, differentiation assays and plate adherence growth until passage 6 of culture.

To assess which biological function was more significative, genes with differential expression and statistic difference were classified by their biological function using Gene Ontology (GO).

Subsequently we performed a gene set enrichment analysis (GSEA) in both samples and we divided the genes in two categories:

- First category included growth factor and cellular differentiation genes, which had shown significative differences between OA group and non-OA group.

- Second category comprehended genes without significative difference between the study groups.

Among the genes contained in first category, we found *COL10A1* and *IGF1*. We performed a SNP analysis of these genes to determinate the possible association between OA development and a particular genotype.

On other hand, we analyzed the effect of an alginate matrix in gene expression, growth factor secretion and MSCs development, to evaluate their clinical application in this kind of biological vehicle.

RESULTS AND DISCUSSION

MSCs are used as therapeutic agents in several tissue injuries. Their characterization is needed to guarantee their success in clinical treatments. In this study, we have verified their growth capacity until passage 6 and their differentiation capacity in mesodermic lineage such as chondrocytes, adipocytes and osteoblast. Furthermore, we have checked the presence of CD90, CD73, CD105 and CD166, MSCs characteristic markers. We did not found any differences in these features between MSCs from OA patients and non-OA donors.

We found 1,967 differentially expressed genes between OA-MSCs and control-MSCs. Interestingly, among these genes, we found a downregulated expression of genes essential for the regenerative potential maintenance in OA-MSCs.

In particular, the expression of type X collagen was specially altered in OA patients and showed a genetic association between the *COL10A1* rs11965969 polymorphism and OA. Type X collagen is sintetized by hypertrophic chondrocytes before ECM mineralization and therefore, it diminishing expression could be responsible of an alteration in subchondral bone formation. On the other hand, it has been showed a relationship between Schmid metaphyseal chondrodysplasia and mutations in *COL10A1*. The presence of rs11965969 polymorphism could indicate a less severe and more prevalent disease such as OA.

Also, we found that 57 of the 73 IGF1 pathway related genes analysed, accounted for the enrichment of the IGF1 gene set in control MSCs and consequently their downregulation in OA-MSCs. IGF1 is an insulin structural and functional analogous, responsible of chondrocyte growth and proliferation, while inhibit chondrocyte apoptosis. We found a relationship between serum IGF1 levels and hip OA severity in Spanish population. Moreover, an IGF1 polymorphism was found significative different between OA patients and non-OA donors. Rs2195239 polymorphism was associated with an increase of the risk to suffer hip OA, although this association diminishing when we limited the comparison with non-OA donors without radiographic OA signs and there are a controversy about the IGF1 role in OA. Therefore, these findings could provide a tool for an early OA diagnosis and a discriminator factor between knee and hip OA.

We did not found significant differences on immunomodulation related genes in the analyzed MSCs. Furthermore, we performed an immunomodulation study on OA-MSCs, where we observed that MSCs maintained their capacity to respond to proinflammatory factors such as IFN γ and TNF α . Indeed, after several weeks on *in vitro* culture, MSCs embedded in an alginate matrix, maintained their immunomodulatory properties and were able to upregulate IDO and IL6 gene expression. These results are promising for the future application of MSCs in localized inflammatory diseases, such as OA, where also, the prolonged action of the treatment could be crucial for clinical success.

CONCLUSIONS

1. Whole genome microarray data showed an altered gene expression profile in OA-MSCs in comparison with non-OA MSCs.
2. Genes related with growth and cell differentiation functional categories such as *COL10A1* and *IGF1* were downregulated in OA-MSCs, while genes related with cell apoptosis were upregulated.
3. The data could indicate a genetic association between rs11965969 SNP of *COL10A1* gene and OA-donors.

4. In this study, we suggested a relationship between serum IGF1 levels, risk of development or severity on hip OA and rs35767 of *IGF1* in Spanish population.
5. We did not found differences on immunomodulatory MSCs properties between OA donors and non-OA donors.
6. OA-MSCs were able to maintain immunomodulatory gene expression after 30 days embedded in alginate beads.

RESUMEN

La artrosis es una enfermedad musculoesquelética causada por un desequilibrio entre factores catabólicos y anabólicos que desemboca en la pérdida del cartílago articular, la inflamación sinovial y cambios en el hueso subcondral.

En la actualidad no existe ningún tratamiento farmacológico efectivo, más allá del alivio del dolor, para el tratamiento de la artrosis, y en cualquier caso no se logra una recuperación de los tejidos de la articulación dañada. En este contexto, las propiedades de autorenovación, pluripotencialidad e inmunomodulación de las células madre mesenquimales (CMMs) aplicadas mediante las nuevas terapias celulares son esperanzadoras. No obstante, tanto si las células son utilizadas de forma autóloga como alogénica, es necesario determinar cómo la propia patología puede limitar el potencial terapéutico de estas células.

En este estudio, se usó un microarray de ADN para analizar las diferencias transcripcionales en las CMMs de pacientes con artrosis y sujetos control sin artrosis con el fin de analizar las características de las CMMs con la vista puesta en su uso terapias celulares.

En las CMMs de artrosis se encontraron regulados a la baja genes relacionados con la capacidad regenerativa de las CMMs, en concreto, el gen *COL10A1* y la ruta de señalización IGF1. Además se encontraron asociaciones genéticas entre SNPs de estos genes y artrosis, rs11965969 en el caso de *COL10A1* y rs35767 en el caso de *IGF1* en la población española.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los genes relacionados con la capacidad inmunomoduladora de las CMMs entre ambos grupos analizados. Se realizó un estudio complementario sobre la inmunomodulación de las CMMs en pacientes artrósicos, donde observamos que las CMMs de estos pacientes conservan la capacidad de responder a factores proinflamatorios, incluso tras varias semanas en cultivo *in vitro* en una matriz de alginato, abriendo así las expectativas de aplicación de este sistema en enfermedades con un componente inflamatorio como es la artrosis.

ABSTRACT

Osteoarthritis is a musculoskeletal disease caused by an imbalance between catabolic and anabolic factors, which leads to articular cartilage loss, sinovial inflammation and subchondral bone changes.

Up to date, there is not effective drug treatment for osteoarthritis, beyond a pain relief. Anyway, the regeneration of tissues from the damaged joint is not achieved. In this context, the application of mesenchymal stem cells (MSCs), given their capacities of self-renewal, pluripotency and immunomodulation, could be hopeful. Nevertheless, both, in autologous or allogenic MSCs therapies, it should be necessary to determine whether in a pathologic environment, such as osteoarthritis, these properties are altered limiting the therapeutic potential of these cells.

Aiming to determine the suitability of MSCs in cell therapies, in this study a DNA microarray was used to comparatively describe the transcriptional differences between MSCs, obtained from osteoarthritic patients, and those from non-OA donors.

Interestingly, we found a downregulated expression of genes essential for the regenerative potential maintenance in OA-MSCs; in particular, in *COL10A1* gene and in genes involved in the IGF1 signaling pathway. Moreover, we also found an OA genetic association, in spanish population, with single nucleotide polymorphisms in the *COL10A1* and *IGF1* genes.

On the other hand, in the analyzed MSCs, no significant differences were found with regard to immunomodulation related genes. Furthermore, we performed an immunomodulation study on osteoarthritic MSCs, where we observed that MSCs maintained their capacity to respond to proinflammatory factors. Indeed, after several weeks on *in vitro* culture, MSCs embedded in an alginate matrix, maintained their immunomodulatory properties. These results are promising for the future application of MSCs in localized inflammatory diseases, such as osteoarthritis.

ABREVIATURAS

ACR: Colegio Americano de Reumatología. Del inglés: <i>American College of Rheumatology</i> .	Cy3: Cianina 3
ACTB: β -actina.	Cy5: Cianina 5
ADN: Ácido desoxirribonucleico	DACT1: Antagonista dapper de la β -catenina 1
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario	DCs: Células dendríticas
AFE= Agilent Feature Extraction	EAE: Encefalomielitis experimental autoinmune
AINES: Antiinflamatorios no esteroideos	ECM: Matriz extracelular
ALP: Fosfatasa alcalina	EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ANOVA: Análisis de la varianza. Del inglés: Univariate Analysis of Variance	ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
APC: Aloficocianina	ESR: Ratio de sedimentación eritrocítica
ARN: Ácido ribonucleico	FBS: Suero fetal bovino
BAD: Promotor de muerte asociado a Bcl2	FDR: Ratio de falsa coincidencia
BARX1: BARX homeobox 1	FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2
BCR: Proteína de la region de ruptura. Del inglés: <i>Breakpoint Cluster Region protein</i>	FGFs: Factores de crecimiento transformantes
BKI: Media de CT de tres genes constitutivos	GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
BMI: Índice de masa corporal	GARTROSISL: Estudio Artrosis y Estilo de Vida
BMP: Proteína morfogenética de hueso	GDF5: Factor de crecimiento de diferenciación 5
BMPs: Proteínas morfogenéticas del hueso	GO: Ontología genética
Células Treg: Células T reguladoras	GSEA: Enriquecimiento de Juegos Génicos
CMMS: Células madre mesenquimales	HAQ: Cuestionario de evaluación de la salud
col.: Colaboradores	HGF: Factor de crecimiento hepatocítico
COMP: Proteína oligomérica de matriz	HLA: Antígeno humano leucocitario
COX2: Ciclooxygenasa 2	HLA-G: Antígeno leucocitario humano G
CSF: Factor estimulador de colonias	HO-1: Hemooxygenasa 1
CSK: Tirosin kinasa c-src	HPRT: Hipoxantina fosforibosiltransferasa
	IC: Intervalo de confianza

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina	NES: Grado de enriquecimiento normalizado
IDO: Indoleamina 2,3 – dioxigenasa	ng: Nanogramos
IFN γ : Interferon γ	NK: Natural killer
IGF: Factor de crecimiento insulínico	nm: Nanómetros
IGF1: Factor de crecimiento insulínico 1	NO: Óxido nítrico
IGF1r: Receptor del IGF1	NOM: Nominal
IL: Interleucina	NR: Ratio de normalización
IL1RN: Receptor antagonista de IL1	OR: Odds ratio
IL6: Interleucina 6	PAI1: Inhibidor de plasminógeno activado 1
iNOs: Óxido nítrico sintasa inducible	PBS: Tampón fosfato salino
ITS: Insulina-transferrina-selenio	PC5: Alofocianina, cianina 5
KL: Kellgren-Lawrence	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
KYN: Kinurenina	PDGF: Factor de crecimiento plaquetario
LG-DMEM: <i>Low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	PE: Ficoeritrina
MCGS: Factores de crecimiento para el crecimiento de CMMs	pg: Picogramos
mg: Miligramos	PGE2: Prostaglandina E2
ml: Mililitros	PPAR γ : Receptor de proliferación activado del peroxisoma gamma
mm: Milímetros	PYK2: Proteína tirosina kinasa
mM: Milimolar	RGD: Alginato modificado covalentemente con el tripeptido arginina-glicina-ácido aspartico
MMLV: Virus de la leucemia murina de Moloney	RSPO: R-Spondina
MMPs: Metaloproteinasas	RT: Transcripción inversa
MO: Médula ósea	SFRP: Proteínas secretadas relacionadas con Frizzled
MPR: Receptor manosa fosfatos. Del inglés: <i>Mannose 6-phosphate receptor</i>	SNP: Polimorfismos de una sola base
NaCl: Cloruro sódico	

SPP1: Osteopontina	UBC: Ubiquitina C
SSEA: Antígeno específico de etapa embrionaria	VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial
TGFβ: Factor de crecimiento transformante β	vWF: Factor von Willebrand.
TGFβ1: Factor de crecimiento transformante β 1	WOMAC: Índice de artritis de las Universidades Western Ontario y McMaster
TIMP: Inhibidor de metaloproteinasas característico de tejido	μg = Microgramos
TLR: Receptor tipo Toll	μl = Microlitros
TNF: Factor de necrosis tumoral	μm = micra (micrómetro)
Trp: Triptófano	

INTRODUCCIÓN

1. La artrosis

La artrosis es una enfermedad articular degenerativa y discapacitante, que se produce debido a un desequilibrio metabólico entre los factores catabólicos y los anabólicos^[1]. Su principales síntomas son el dolor y la rigidez articular y se caracteriza por la degeneración progresiva del cartílago articular, la esclerosis del hueso subcondral y la inflamación de la membrana sinovial^[2] (Figura 1).

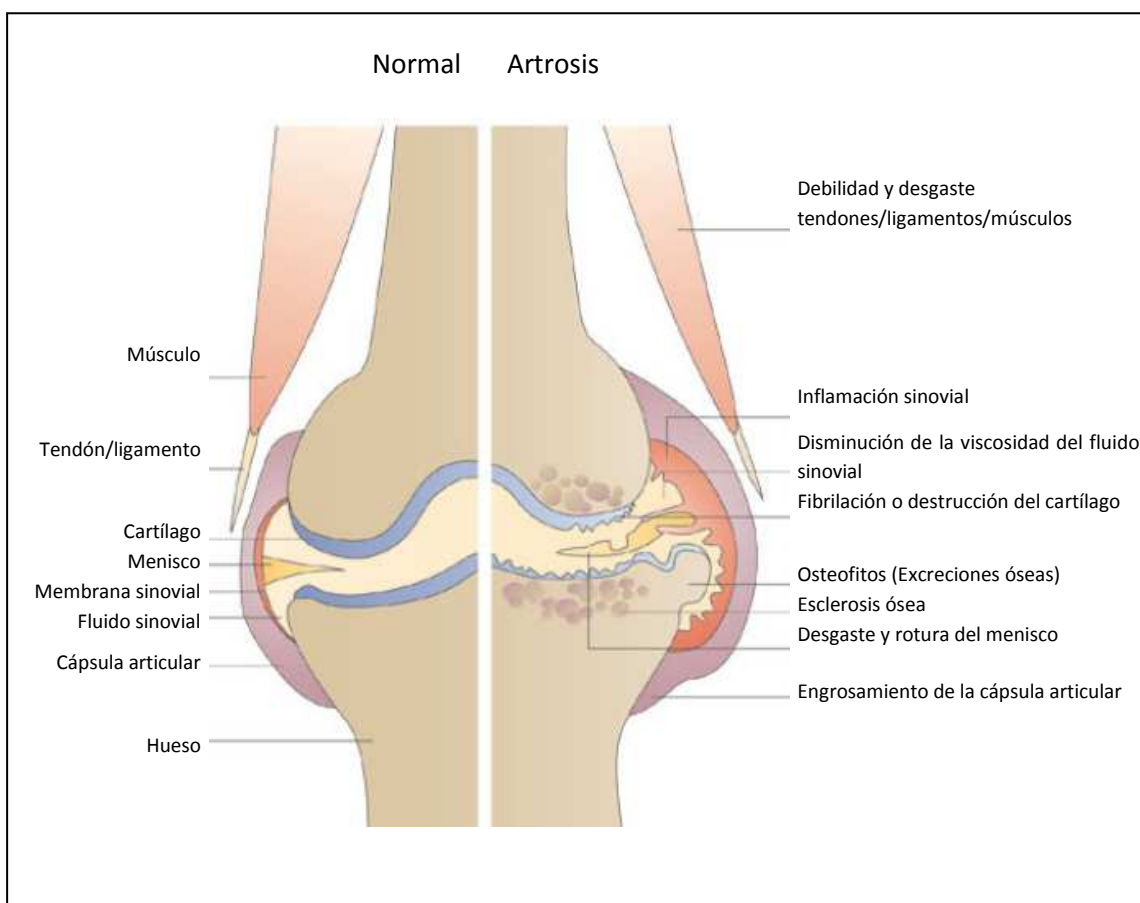


Figura 1. Esquema representativo de una rodilla normal y una rodilla con artrosis. Entre los cambios más significativos, en la rodilla artrósica se distinguen: la fibrilación del cartílago, la inflamación sinovial, la esclerosis ósea, la presencia de osteofitos, el engrosamiento de la cápsula articular, el desgaste del menisco, la debilidad de los tendones, ligamentos y músculos y la reducción de la viscosidad del fluido sinovial. Adaptado de Wieland y col. ^[3].

La artrosis es el desorden musculoesquelético más frecuente y una de las causas más importantes de discapacidad a nivel mundial^[4]. Ocupa el cuarto lugar entre las enfermedades discapacitantes que afectan a las mujeres y el octavo puesto entre los

hombres^[5, 6]. En España, su prevalencia se sitúa en torno al 10%, y afecta en mayor medida a las mujeres^[7].

Por otra parte, y desde un punto de vista económico, los gastos generados por la enfermedad son importantes. En el año 2009, un estudio de los costes derivados del tratamiento de pacientes artrósicos de rodilla y/o cadera, cifró en 1.502 euros el coste total anual por paciente en España, donde los costes directos alcanzaban el 86% del total y el coste nacional se aproximaba a 4.738 millones de euros, lo cual representaba el 0,5% del producto nacional bruto^[8].

1.1. Criterios de diagnóstico de la artrosis

Según el Colegio Americano de Reumatología (ACR), el diagnóstico de artrosis se basa en los siguientes criterios clínicos en función de la articulación afectada^[9-11]:

Rodilla: el paciente debe referir dolor en la rodilla, presentar formación de osteofitos definidos radiológicamente y pertenecer al menos a una de las siguientes categorías: tener más de 50 años, presentar rigidez matinal de menos de 30 minutos o sufrir crepitación articular al movimiento.

Cadera: el paciente debe referir dolor en la cadera y al menos presentar dos de las siguientes características: un ratio de sedimentación eritrocítica (ESR) menor de 20 mm en la primera hora, formación de osteofitos femorales o acetabulares definida radiológicamente o mostrar un estrechamiento del espacio articular también definido radiológicamente.

1.2. Clasificación y estructura de la articulación

Se entiende por articulación la zona de unión entre dos huesos, su principal función es proporcionar estabilidad y movilidad al esqueleto. En función del tipo de movilidad permitida, las articulaciones pueden clasificarse en los siguientes grupos: sinartrosis, anfiartrosis y diartrosis o sinoviales. Las sinartrosis son aquellas articulaciones carentes de movimiento, como las existentes en los huesos craneales. Las anfiartrosis, poseen

movimiento aunque limitado. Y las diartrosis o articulaciones sinoviales, además de ser las que permiten una mayor amplitud de movimientos, como rodillas, codos y articulaciones de los dedos, son las articulaciones mayoritarias y las más afectadas en la patología artrósica.^[12] En este trabajo, nos hemos centrado en el estudio de la artrosis de las articulaciones de tipo sinovial.

Los componentes estructurales básicos de las articulaciones diartrodiales son el cartílago, el hueso subcondral y la membrana sinovial.

1.2.1. El cartílago articular

El cartílago articular o hialino se encarga de minimizar el rozamiento entre las superficies articulares. Su grosor normal oscila entre 1 y 5 mm y alberga una población celular denominada condrocitos. Los condrocitos o células del cartílago, están embebidos en una matriz extracelular (ECM), formada por agua, proteoglicanos y una red de colágeno tipo II (Figura 2). La red de colágeno confiere la fuerza tensil del cartílago mientras que los proteoglicanos, como el agregano, al ser hidrofílicos, absorben el agua y proporcionan al cartílago su habilidad para resistir la compresión y distribuir la carga^[12]. Es un tejido avascular y alinfático, por tanto, los nutrientes se difunden desde el líquido sinovial hacia el interior del cartílago articular^[12].

El cartílago articular está estructurado en tres capas: la capa superficial, la capa media o de proliferación y la capa radial o profunda.

Capa superficial: Contiene condrocitos metabólicamente inmaduros. La densidad celular de esta zona es más alta que en el resto de capas y sus condrocitos tienen forma aplanada. Las fibras de colágeno se disponen paralelas entre ellas y a la superficie de la articulación.

Capa media o de proliferación: Posee células metabólicamente activas y maduras. Los condrocitos se presentan redondeados o en grupos isógenos (dos condrocitos juntos) rodeados de una gran cantidad de matriz extracelular creada a partir de sus propias secreciones, principalmente, de proteoglicanos y colágeno tipo II.

Capa radial o profunda: Las células son de mayor tamaño y se disponen en columnas, es en esta capa donde la matriz empieza a calcificarse.

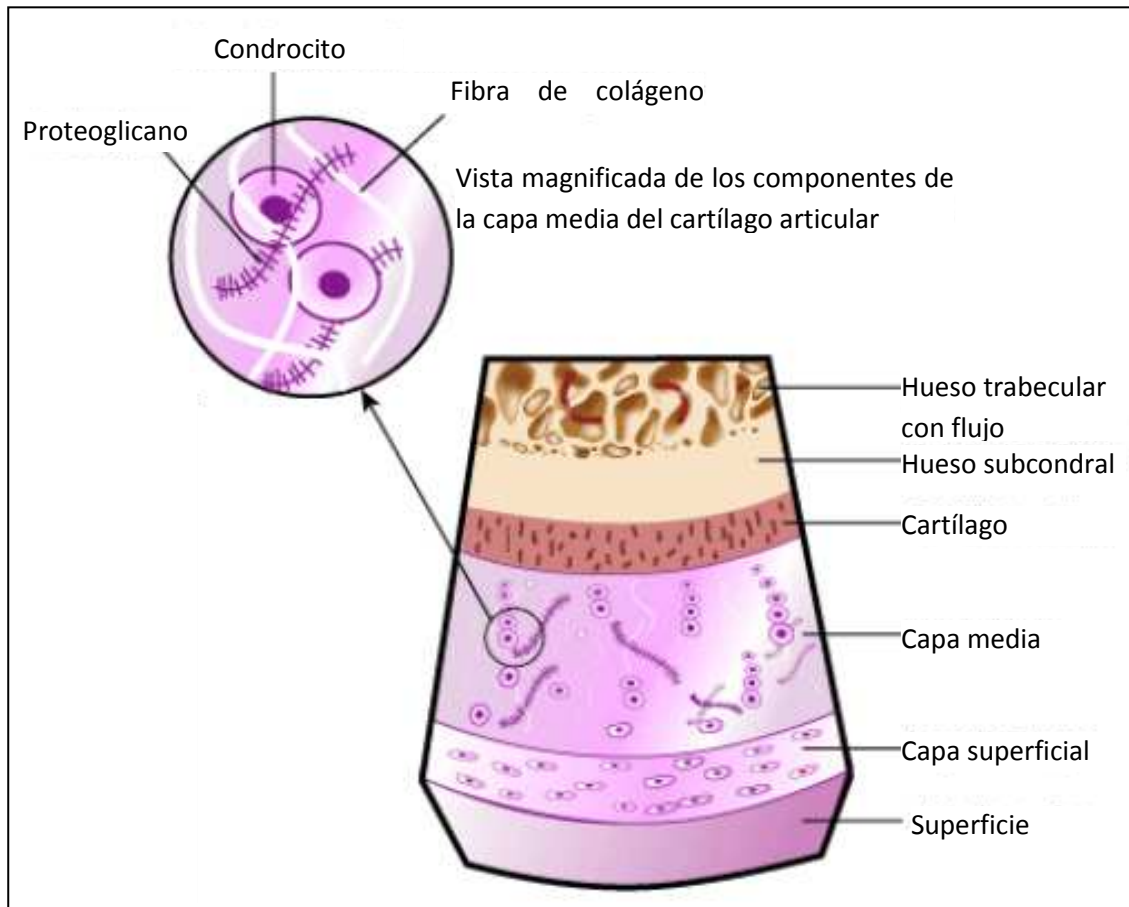


Figura 2. Diagrama microscópico del cartílago articular. Adaptado de la web del grupo de traumatólogos y cirujanos ortopédicos San Antonio^[13].

1.2.2. El hueso subcondral

El hueso subcondral es una capa formada por fibrillas de colágeno tipo II incrustadas con hidroxipatita y contiene condrocitos metabólicamente inactivos. Está separado del cartílago por una capa de cartílago calcificado que actúa como interfase.

El hueso subcondral, posee una organización específica. Es más fino que el hueso compacto o cortical y contiene sistemas harvesianos (laminillas de hueso compacto dispuestas concéntricamente alrededor de un canal vascular) que discurren paralelos a la articulación y no al eje longitudinal del hueso. Además, sus puntos centrales de apoyo en el hueso trabecular se disponen en ángulo recto a los puntos de mayor estrés en la articulación^[12].

En la artrosis la desestructuración de las trabéculas no es apreciable. Sin embargo, son más frecuentes las geodas (disminución de la masa ósea) y la esclerosis (aumento de la masa ósea) alrededor de las geodas en el hueso subcondral (Figura 3).

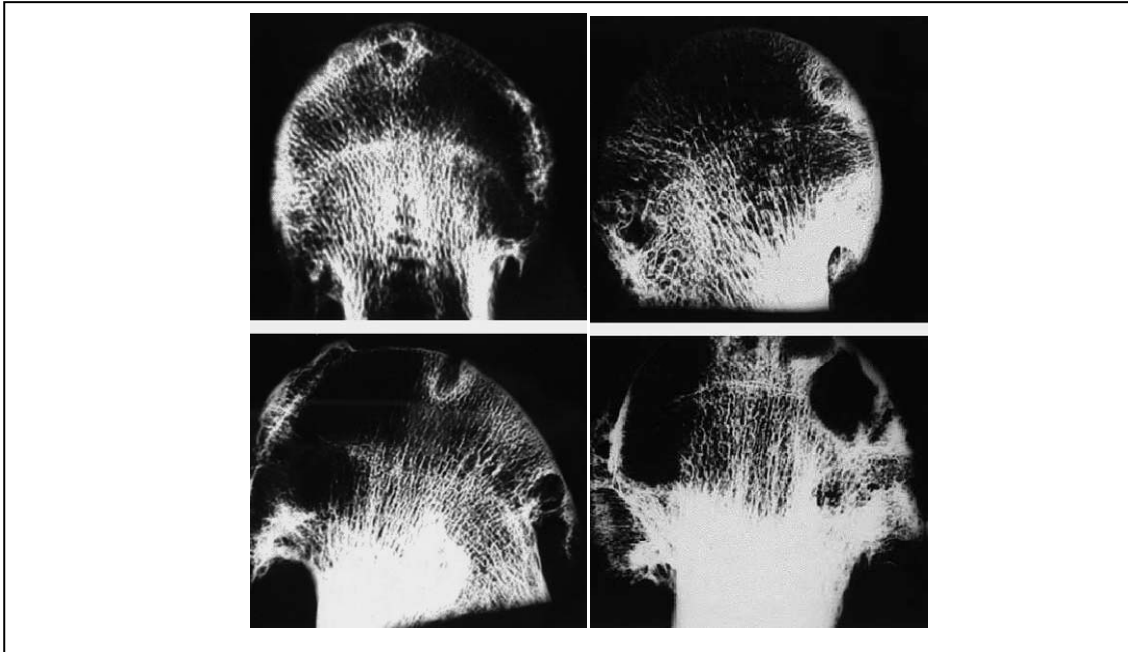


Figura 3. Radiografías de contacto de cortes de cabeza femoral artrósicas. Adaptado de Forriol Campos, 2002^[14].

1.2.3. La membrana sinovial

La membrana sinovial o sinovio, es una membrana rica en vasos sanguíneos y linfáticos que tapiza la cara interna de la cápsula articular, y la responsable de la secreción del líquido sinovial.

Está formada por dos capas, la capa íntima o interna y la capa profunda o subíntima. En la capa íntima coexisten dos tipos de sinoviocitos (células de la membrana sinovial), tipo A y tipo B. Los sinoviocitos tipo A, o macrofágico son los que aclaran los desechos internos de la membrana. Los sinoviocitos tipo B, que son los más abundantes, se asemejan a fibroblastos y sintetizan ácido hialurónico que junto con la lubricina, constituyen los dos componentes esenciales del líquido sinovial, al que confieren sus propiedades reductoras del coeficiente de fricción entre las superficies de la articulación^[12].

La capa subíntima se compone de tejido adiposo, fibroso y areolar, conformando una ECM a base de colágeno tipo VI, III, I y V, así como hialuronato, fibronectina, decorina y biglicano.

El sinovio posee componentes linfáticos y del sistema inmune, tanto celular como humoral. Además posee una red neural que provee retroalimentación nociceptiva para controlar el flujo de sangre sinovial^[12].

1.3. Origen y mecanismos asociados a la artrosis

La artrosis ha sido considerada durante mucho tiempo como un desorden del cartílago inducido por la acumulación de estrés mecánico^[15]. En la actualidad, se asume que su inicio y su progresión son procesos independientes y es considerado como un desorden multifactorial asociado a diferentes factores de riesgo (Figura 4), entre otros: el envejecimiento, los desórdenes metabólicos, las lesiones articulares o las mutaciones genéticas en genes codificantes de moléculas de la matriz del cartílago^[16-18].

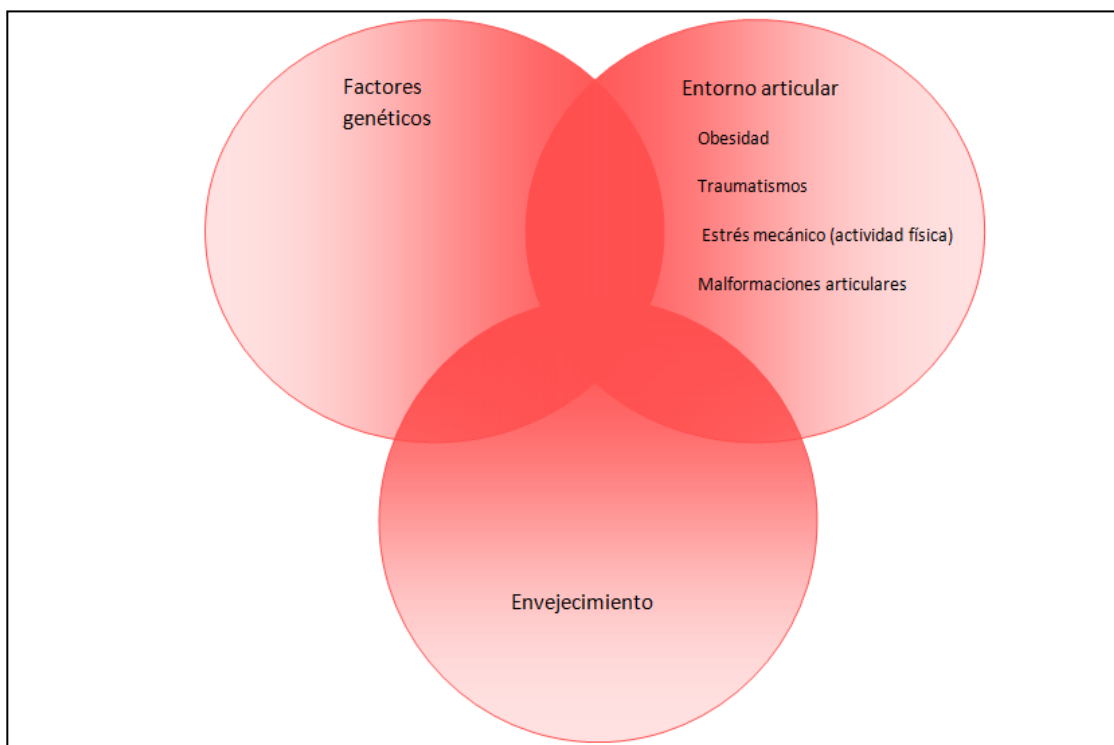


Figura 4. Factores de riesgo implicados en la aparición de artrosis. Se distinguen tres grandes grupos de factores: genéticos, relacionados con la edad y relacionados intrínseca o extrínsecamente con el propio entorno articular.

Desde un punto de vista genético, es interesante destacar que entre el 39-78% de los casos de artrosis pueden atribuirse a este componente, como así parecen evidenciar distintos estudios de herencia genética^[19-21].

1.3.1. Mecanismos asociados a la artrosis

Dentro de los mecanismos asociados a la artrosis se puede distinguir entre los mecanismos genéticos y los mecanismos moleculares y celulares.

1.3.1.1. Mecanismos genéticos

Aunque varios genes han sido asociados con el desarrollo de artrosis primaria, esta asociación ha sido muy difícil replicar en diferentes cohortes de pacientes con artrosis. Así, los meta-análisis publicados muestran una gran variabilidad entre los estudios analizados debido al diferente diseño y poblaciones estudiadas^[22]. Además, la asociación de estos múltiples factores genéticos difiere en función de la articulación o localización específica (manos, cadera, rodilla o columna) en la que actúa el producto del gen. Así, el desarrollo de la patología es el resultado de los efectos aditivos de estos genes y no del efecto individual de un gen concreto^[23].

Los genes candidatos más asociados a la artrosis están implicados en rutas de señalización intracelular implicadas en el crecimiento y diferenciación de las células que conforman y mantienen la integridad de las estructuras articulares. Algunas de las señales de transducción implicadas en la formación de la articulación se estimulan mediante proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), factores de crecimiento transformantes (FGFs) y proteínas de la familia de la WNT (incluyendo la señalización vía β -catenina) que es esencial durante el desarrollo del cartílago y del hueso^[24]. La asociación de ésta última, con la artrosis ha sido demostrada en modelos animales^[18].

Entre los genes candidatos identificados, y que no forman parte de las proteínas estructurales, están: el gen de la proteína 3 secretada relacionada con frizzled (*SFRP3*), la asporina y los factores genéticos Von Willebrand^[25, 26]. Sin embargo, estas asociaciones no han podido ser reproducidos en estudios de poblaciones caucásicas más grandes ni en meta-análisis. A este respecto, el factor de crecimiento de diferenciación 5

(*GDF5*), sí se ha logrado confirmar en amplios meta-análisis de poblaciones caucásicas^[27-30].

También se han asociado a la artrosis a genes relacionados con la ECM de los condrocitos del cartílago articular así como las mutaciones puntuales en los genes de los colágenos *COL2A1*^[31], *COL4A1*, *COL5A1*, *COL6A1* y el gen de la proteína oligomérica de matriz (*COMP*)^[32].

En modelos animales experimentales, existen evidencias de desordenes genéticos que afectan a la arquitectura del hueso subcondral y que son susceptibles de causar artrosis. Por ejemplo, en ratones con una mutación nula en la proteína latente 3 de unión al factor de crecimiento transformante β (TGF β), que regula la activación de TGF β , se desarrollan osteoesclerosis y artrosis^[33], mientras que un defecto en el gen *COL1A1* provoca una rápida progresión de la artrosis en estos animales^[34].

En estudios recientes de poblaciones, los análisis de ligamiento de genoma completo ofrecen una idea de los posibles genes implicados en un aumento del riesgo de sufrir la enfermedad^[35]. En este aspecto, el cromosoma 2q se ha encontrado positivo en varios análisis, sugiriendo que podría englobar uno o varios genes relacionados con la susceptibilidad a sufrir artrosis. Entre los genes que se han localizado en esta región se encuentran los genes de las citocinas del grupo interleucinas (IL), en concreto, *IL1 α* , *IL1 β* y el antagonista del receptor de IL1 (*IL1RN*), todos ellos asociados con el desarrollo primario de artrosis de rodilla pero no de cadera^[36].

De hecho, variantes de los haplotipos de *IL1RN* se han asociado con severidad radiográfica de la artrosis. En otro de estos estudios se han identificado variantes de la ciclooxigenasa (*COX2*) involucradas en el riesgo de sufrir artrosis de rodilla^[37]. Estas asociaciones genéticas son subyacentes al cada vez más prominente papel de las rutas inflamatorias en la patogénesis de la artrosis de rodilla.

1.3.1.2. Mecanismos moleculares y celulares

En la Figura 5 se representa la compleja red de señalizaciones moleculares y celulares que juegan un papel importante en esta patogénesis.

En condiciones fisiológicas, los condrocitos actúan como sensores mecánicos en respuesta al estrés, produciendo matriz extracelular (proteoglicanos y colágeno tipo II). Por el contrario, en artrosis el metabolismo de los condrocitos se altera y éstos inducen la producción de proteasas y mediadores inflamatorios como las citocinas IL1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) que disminuyen la síntesis de colágeno e incentivan la producción de proteasas (metaloproteinasas de la matriz del cartílago; MMPs) y otras moléculas inflamatorias como la IL8, la IL6, la prostaglandina E2 (PGE2) y el óxido nítrico (NO) ^[38].

Entre los cambios más característicos que se producen en el cartílago artrósico, cabe destacar la formación del condrocito hipertrófico, caracterizado por el aumento de la producción de MMP13, colágeno tipo X y fosfatasa alcalina ^[39]. Este fenotipo, provoca la apoptosis de los condrocitos y la osificación endocondral ^[40].

Por otro lado, el condrocito también posee mecanismos de defensa, consistentes en controlar el balance entre enzimas activas y latentes a través de dos inhibidores enzimáticos: el inhibidor de metaloproteinasas característicos de tejidos (TIMP) y el inhibidor de plasminógeno activado 1 (PAI1) ^[41]. Ambos se sintetizan en grandes cantidades bajo la regulación de TGF β 1 ^[40]. Sin embargo, la producción local de factores de crecimiento anabólicos, tales como factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1) y TGF β en osteofitos de pacientes con artrosis de cadera, contribuye a la formación de más osteofitos y al remodelado del hueso subcondral ^[42], junto con un aumento de la angiogenesis osteocondral debido a la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ^[43].

Otro de los factores importantes en el desarrollo de la patología es la inflamación, a pesar de estar confinada a áreas adyacentes a la lesión del cartílago o hueso, provocando una activación del sinoviocito y la posterior liberación de proteinasas y citocinas como la colagenasas o la estromielisina, que pueden acelerar la destrucción del cartílago

cercano. Aunque el cartílago es el principal responsable de la producción de estas moléculas destructivas, los productos resultantes de su degradación mecánica o enzimática pueden provocar la liberación de colagenasas y otras enzimas hidrolíticas que aumentan la hiperplasia vascular en la membrana sinovial. Secuencialmente, la membrana sinovial produce la inducción de $IL1\beta$ y $TNF\alpha$, aumentando aún más el efecto inflamatorio^[44].

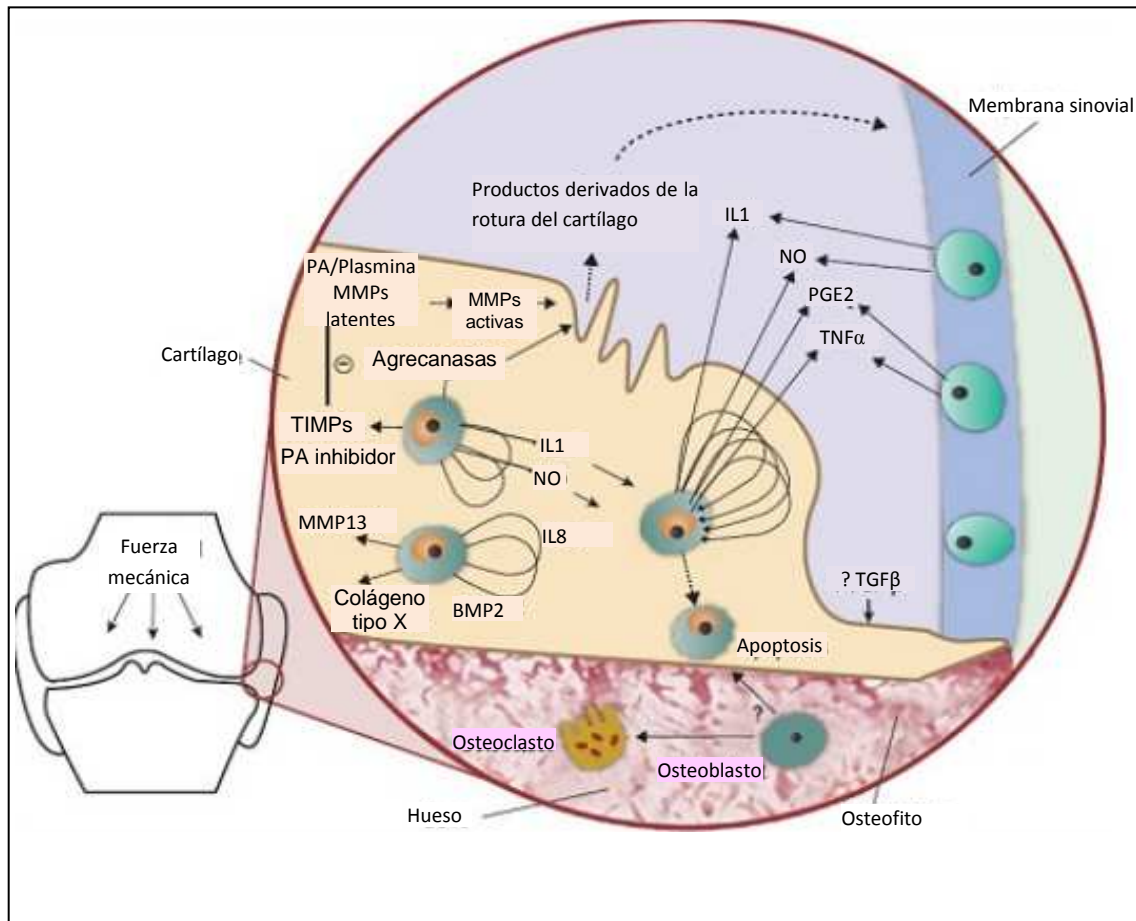


Figura 5. Red de mecanismos moleculares y celulares que intervienen en el inicio y la perpetuación de la artrosis. Adaptado de Abramson y col.^[40].

1.4.Tratamiento de la artrosis

Hasta la fecha, no existe un tratamiento capaz de estabilizar o revertir esta enfermedad. Los pacientes con este tipo de desórdenes se manejan con una combinación de agentes farmacológicos y no farmacológicos que son elegidos por poseer efectos secundarios mínimos. Teniendo en cuenta que el principal objetivo de este tratamiento es el control del dolor y la mejora de la calidad de vida del paciente, la primera línea de tratamiento consiste en una guía de consejos asistenciales, ejercicios físicos y pérdida de

peso, seguida por la prescripción de analgésicos y de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), que son los fármacos más prescritos para el manejo de la artrosis^[45]. En paralelo, la fisioterapia, las infiltraciones de corticoesteroides o el uso de bastones o muletas, entre otros, son aplicables. Recientemente, se estudian otras terapias alternativas como el uso de condroitin sulfato, sulfato de glucosamina, inyecciones de ácido hialurónico, de plasma rico en plaquetas y de células madre mesenquimales (CMMs).

Las CMMs han generado un gran interés en las estrategias terapéuticas basadas en células. Sin embargo, y hasta el momento, el último paso del tratamiento para los casos donde las estrategias conservativas no han logrado solucionar los síntomas de la artrosis es el reemplazamiento quirúrgico de la articulación (Figura 6).

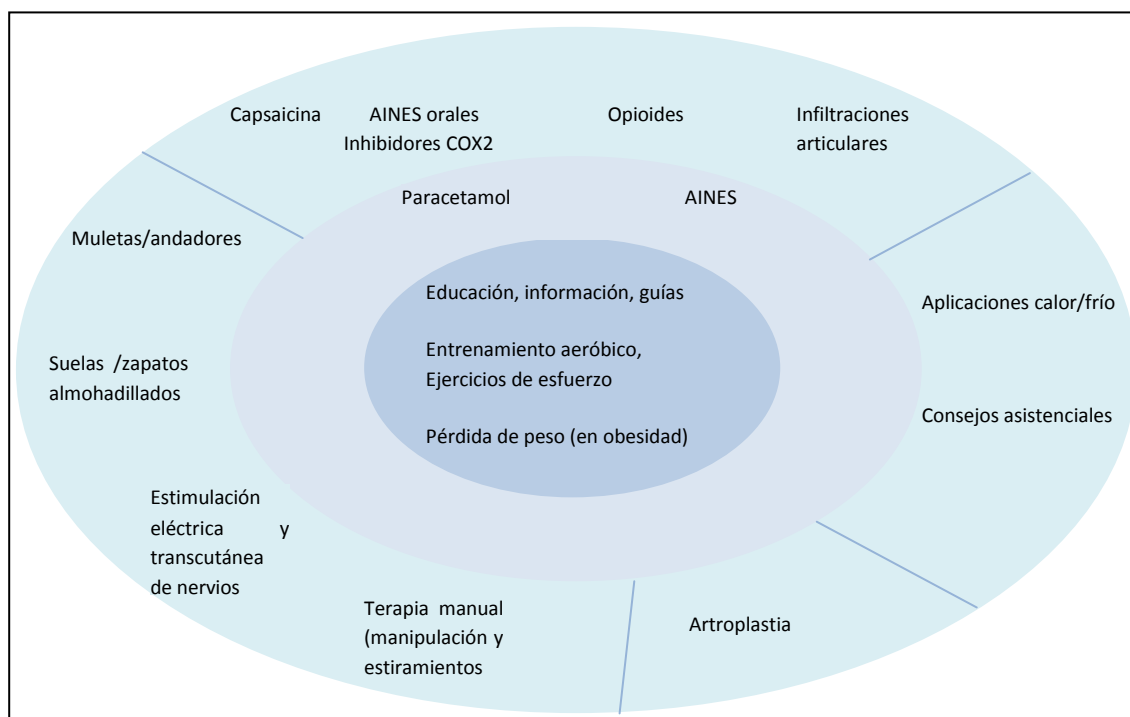


Figura 6. Tratamientos clásicos para combatir los síntomas de la artrosis. Existen varias escalas, combinables entre sí, para el tratamiento de la artrosis: cambios en el estilo de vida, medicación contra el dolor, fisioterapia, terapias alternativas y por último el reemplazamiento articular mediante cirugía ortopédica. Adaptado de Conaghan y col.^[46].

2. Las células madre mesenquimales (CMMs)

Las CMMs son células multipotentes que presentan características de las células madre como su capacidad de autorenovación y su potencial para diferenciarse hacia diferentes linajes mesodérmicos (entre otros: el hueso, el cartílago, los músculos, el tendón y el tejido adiposo)^[47, 48] (Figura 7).

Las principales funciones biológicas de estas células son el mantenimiento y la regeneración del tejido envejecido, reemplazando a las células perdidas^[49].

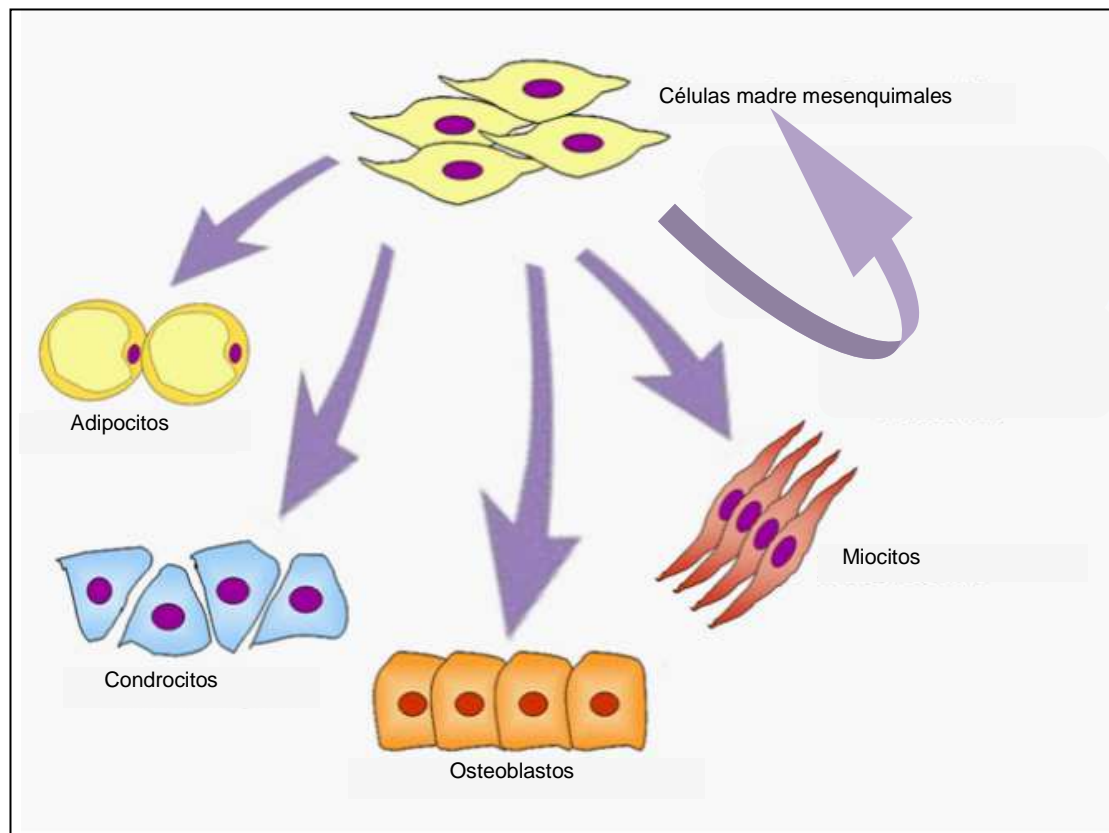


Figura 7. Multipotencialidad de las CMMs. Las CMMs son capaces de autorenovarse y originar múltiples linajes como: adipocitos, condrocitos, osteoblastos o miocitos, entre otros. Adaptado de Meregalli y col^[50].

2.1. Origen y fenotipo de las CMMs

Las CMMs están presentes en múltiples tejidos, entre otros el tejido adiposo, la membrana sinovial, los dientes de leche, el cordón umbilical o los vasos sanguíneos^[51],^[52-54]. Las más estudiadas y abundantes son las CMMs aisladas de la médula ósea. Aunque el patrón de expresión génica es muy similar, independientemente de su tejido de origen, existen algunas diferencias, como se muestra en la tabla I. Se puede por lo tanto cuestionar la equivalencia de estos fenotipos, aunque la mayoría de los estudios muestran que las células seleccionadas poseen multipotencialidades semejantes, si no exactamente iguales^[55].

En general, se acepta que las CMMs, *in vitro*, son células capaces de formar colonias de tipo fibroblástico, adherirse al plástico de cultivo y que pueden diferenciarse al menos a tres linajes: osteoblástico, adipocítico y condrocítico^[56]. No obstante, se debe considerar que las CMMs exhiben cierta variación en su patrón de expresión génica propia del paciente, del método de aislamiento y los pases de expansión^[57].

Tabla I. Diferentes fenotipos de las CMMs humanas según su tejido de origen^[55]. ALP: Fosfatasa alcalina; BMP: Proteína morfogenética de hueso; CSF: Factor estimulador de colonias; GDF: Factor de crecimiento de diferenciación; HLA: Antígeno humano leucocitario; IL: Interleucina; PDGF: Factor de crecimiento plaquetario; SSEA: Antígeno específico de etapa embrionaria; TLR: Receptor tipo Toll; TNF: Factor de necrosis tumoral; VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial; vWF: Factor von Willebrand.

Tejido origen de CMMs	Expresión Fenotípica		Potencialidad de originar tres linajes celulares
	Positiva	Negativa	
Médula ósea ^[58]	CD29, CD44, CD105, CD166	CD34, CD45	SÍ
Células perivasculares del cordón umbilical ^[58]	CD146, NG2, PDGF-Rb, ALP, SSEA4, Oct4	CD34, CD45, CD144, vWF	SÍ
Gelatina de Wharton ^[59, 60]	CD44, CD90, CD105, HLA G6, IL1A/B, IL6, IL8, IL14, BMP1, CSF3, FAMC3, GDF15, PDGF-B, TNF4, TNF11B, TNF12, VEGF	CD34, CD40, CD45, CD80, CD86	SÍ
Mucosa nasal ^[61]	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, TLR4 ligando		SÍ

Tejido origen de CMMs	Expresión Fenotípica		Potencialidad de originar tres linajes celulares
	Positiva	Negativa	
Estroma intestinal ^[62]	CD29, CD44, CD73, CD105, CD117, CD166	CD14, CD34, CD45	SÍ
Mucosa intestinal ^[62]	CD117, CD29, CD44, CD73, CD105, CD117, CD166		SÍ
Estroma limbal del ojo ^[63]	CD105, CD106, CD54, CD166, CD90, CD29, CD71, pax-6/p75, SSEA1, Tra-1-61, Tra-1-81, CD31, CD34, CD45, CD11a, CD11c, CD14, CD138, Flk1, Flt1	Caderina endotelial vascular	No. Adipogénico y osteogénico solamente.
Osteosarcoma estromal ^[64]	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA class I	CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, HLA-DR	SÍ

2.2. CMMs en la medicina regenerativa

Debido a su facilidad de aislamiento, manipulación y seguridad, las CMMs han sido utilizadas como agentes terapéuticos en varios modelos experimentales de lesiones tisulares^[65-70]. Estas células pueden expandirse *in vitro* en grandes cantidades y ser utilizadas en tejidos no inmunológicamente coincidentes debido a que son levemente inmunogénicas^[71].

La mejoría de los tejidos dañados tras ser tratados con CMMs ha sido demostrada experimentalmente en varios trabajos; sin embargo, la integración tisular o la diferenciación de estas células, no era relevante^[72]. Así, en modelos de administración intraparenquimal, se observa una muerte temprana de las células integradas y en modelos de administración sistémica, solo una pequeña proporción de las células alcanza la diana para la que fueron introducidas^[73-77]. Estos datos, parecen corroborar que la regeneración ejercida por las CMMs, está mediada a través de factores solubles que alteran el microambiente tisular^[78] estimulando la angiogenesis, reduciendo el estrés oxidativo, disminuyendo la apoptosis^[70, 72] y previniendo la fibrosis^[79].

De este modo, ha podido demostrarse que el medio condicionado de la CMMs es capaz de estimular la proliferación celular endotelial, la migración celular *in vitro* y que la inyección de este medio condicionado por CMMs, en ratones que habían sufrido isquemia en un miembro, era suficiente para mediar la regeneración del flujo sanguíneo en el miembro lesionado^[80]. Resultados similares han sido también observados en modelos de infarto cardíaco^[81] junto con la múltiple secreción de citocinas angiogénicas por parte de las CMMs. En estos medios condicionados por CMMs, se ha encontrado la presencia del factor de crecimiento hepatocítico (HGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), el IGF1 y el VEGF^[70].

2.3. CMMs en inmunomodulación

Las CMMs parecen ser capaces de modular la respuesta inmune. El estudio de esta propiedad inmunosupresora es actualmente el foco de atención para el tratamiento de aquellos casos en los que la inflamación juega un papel importante en la destrucción del tejido, como ocurre en algunos desórdenes inmunes, por ejemplo en la enfermedad injerto contra huésped^[82]. No obstante, esta inmunosupresión, requiere una activación previa de las CMMs por medio de citocinas proinflamatorias como interferon γ (IFN γ), TNF α , IL1 α o IL1 β ^[83-85]. *In vitro*, las CMMs pueden inhibir la producción de anticuerpos por parte de las células B^[86], la generación y función de las células presentadoras de antígenos^[87], la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas proinflamatorias^[88, 89]. *In vivo*, las CMMs son capaces de reducir la actividad inmune en la enteropatía autoinmune^[90], prolongar la supervivencia de aloinjertos de corazón y piel^[91, 92] y mejorar un modelo de colitis experimental^[93].

Los mecanismos responsables de esta inmunomodulación están basados en la producción de la PGE2, de la indoleamina 2,3 – dioxigenasa (IDO) y la producción del NO y en la expresión de citocinas^[94].

En la síntesis de PGE2 participan las enzimas ciclooxigenasas, COX1 y COX2 (las cuales son sobrerreguladas por TNF α y IL1 β ^[95-97]) cuya inhibición mediante indometacina restaura parcialmente la proliferación de las células T, en presencia de CMMs humanas o murinas, sugiriendo un probable papel de esta molécula^[94]. Por

último, se sabe que IDO es una pieza clave en la supresión de la actividad de las células T^[98, 99]. En lo referente a la expresión de citocinas, se ha comprobado que el aumento de la secreción de IL6 por parte de las CMMs es capaz de suprimir a proliferación de los linfocitos T. Esta proliferación linfocitaria puede ser restaurada parcialmente tras la adición de anticuerpos^[87, 100, 101]. Por otro lado, factores de crecimiento como TGF β 1 ejercen un papel protector en el control de la proliferación vascular a través de VEGF^[102], manteniendo la diferenciación de las CMMs e incrementando su efecto inmunomodulador y antiinflamatorio^[103] (Figura 8).

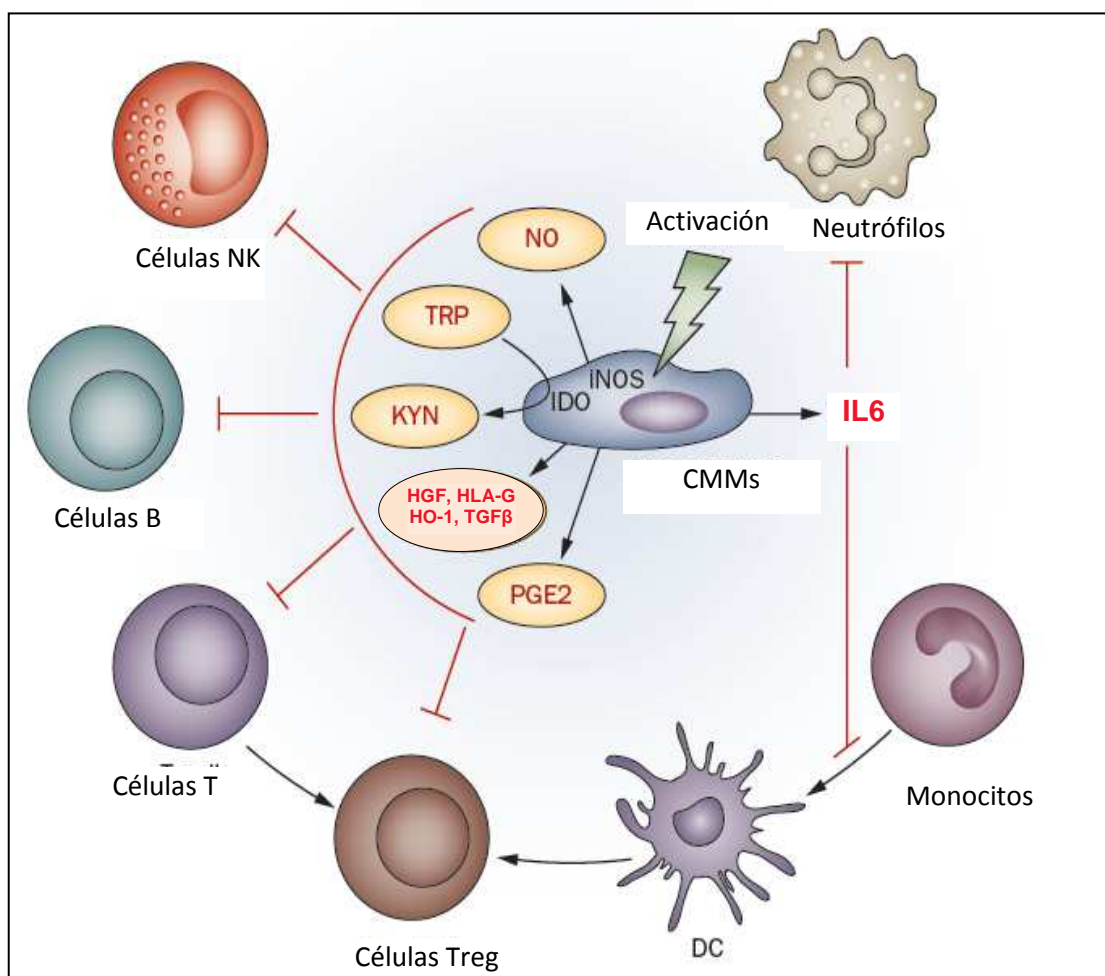


Figura 8. Esquema de las interacciones entre las CMMs y las células del sistema inmune^[79]. Después de activar las CMMs, éstas pueden inhibir la proliferación de las células NK, las células B y las células T. Este efecto es mediado a través de la secreción de varios factores como PGE2, HGF, HLA-G y TGF β . La expresión de HO-1; la producción de NO a través de iNOS o la depleción de Trp en KYN por IDO. La secreción de IL6 podría estar involucrada en la inhibición de neutrófilos o la prevención de la generación y maduración de DCs de los monocitos. Las DCs inmaduras podrían entonces inducir la generación de células Treg. DCs: células dendríticas; HGF: factor de crecimiento hepatocítico; HLA-G: Antígeno leucocitario humano G; HO-1: hemooxigenasa 1; IDO: indoleamina 2,3-dioxigenasa; IL6:

interleucina 6; iNOs: óxido nítrico sintasa inducible; KYN: kinurenina; CMMs: células madre mesenquimales; NK: natural killer; NO: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2; TGFβ: factor de crecimiento transformante β; Células Treg: células T reguladoras; Trp: triptófano.

2.4. Tratamiento de la artrosis con CMMs

La aplicación terapéutica de las CMMs más utilizada es la ingeniería tisular de hueso y cartílago. El procedimiento se ha mejorado con las diferentes combinaciones de CMMs, BMPs y matrices^[104].

Se ha demostrado que *in vitro*, las CMMs son capaces de diferenciarse a condrocitos, prevenir su apoptosis e impedir el desarrollo y progresión de la artrosis^[79].

Sin embargo y hasta la fecha, los condrocitos autólogos representan el único tipo celular que se usa rutinariamente para la reparación del cartílago articular^[105]. Para los trasplantes autólogos de CMMs, sería importante considerar la patología subyacente y la medicación recibida por el paciente. Estas dos variables podrían tener un efecto en el número y la funcionalidad^[106, 107] (factores secretados, estado de diferenciación) de las CMMs^[108].

Existe cierta controversia en relación a la funcionalidad completa o normal de las CMMs asiladas de pacientes con artrosis avanzada^[105]. Estudios como el del Murphy y colaboradores^[109], muestran una disminución de las capacidades proliferativas y condrogénicas de las CMMs, con un mantenimiento intacto de su potencial osteogénico. En contraste Scharstuhl y col.^[110] no observaron cambios en el potencial condrogénico dependientes de la edad o la etiología artrósica. Cuando las CMMs de pacientes artrósicos se utilizan en ingeniería tisular de cartílago, no se encuentran diferencias dependientes de la patología^[111], aunque coexiste un cierto grado de desdiferenciación celular^[105].

2.5. Vías de administración de las CMMs

Debido a que las CMMs tienen una baja tasa de retención y supervivencia una vez implantadas en el sitio del defecto a reparar, es complejo hacer una estimación de

número de células necesario, aunque en general éste ha de ser elevado para conseguir un beneficio clínico evidente. Por otra parte, es necesario considerar los posibles efectos adversos derivados de una inoculación de células concentradas en exceso, entre otros la posible formación de agregados que pueden causar embolias pulmonares o infartos^[112].

Con el fin de evitar estos efectos nocivos se pueden aplicar localmente, en el lugar del defecto o lesión utilizando matrices polimerizadas *in vitro* o *in situ* mediante cirugía, teniendo en cuenta asimismo los riesgos que esto puede suponer^[113].

2.5.1. Matrices utilizadas para la administración de CMMs

El uso de matrices permite la ubicación precisa de las CMMs en el sitio de la lesión o defecto y además ofrecen la posibilidad de establecer modelos *in vitro* de estudio de cultivos en tres dimensiones. Este tipo de ensayos son una herramienta importante para el estudio del desarrollo, del remodelado y la reparación tisular^[105].

Las matrices utilizadas en el campo de las reparaciones musculoesqueléticas constituyen vehículos para la liberación celular y poseen importantes propiedades osteo/condro inductivas y osteo/condro conductivas. Deben tener una integridad estructural suficiente y equilibrios de degradación cinéticos dirigidos a una degradación espontánea cuando la lesión se haya subsanado o a una perpetuación más prolongada de su acción según el tipo de lesión a tratar. Pueden dividirse en 3 grupos atendiendo a sus propiedades mecánicas y composición:

Las **matrices naturales** incluyen colágeno, ácido hialurónico, alginato y quitosan. Poseen escasas propiedades mecánicas pero incentivan la diferenciación de las CMMs de forma más efectiva^[114]. Por ejemplo, el alginato ha sido muy utilizado en la liberación controlada de fármacos o factores de crecimiento, como matriz en ingeniería de tejidos y en estudios *in vitro* de matriz extracelular o para encapsular distintos tipos celulares^[115].

Las **matrices con base mineral** incluyen las cerámicas de fosfato cálcico o el vidrio bioactivo, son más resistentes biomecánicamente aunque sus resultados son poco reproducibles^[116]. Se usan generalmente en regeneración ósea.

Las **matrices de polímeros sintéticos** incluyen hidrogeles de ácido poliglicólico o ácido láctico. Poseen mayores propiedades mecánicas, una cinética de degradación predecible y pueden incorporar pequeñas moléculas con actividad biológica que incentiven el proceso de regeneración^[114].

HIPÓTESIS

La artrosis es una enfermedad musculoesquelética, causada por un desequilibrio entre factores catabólicos y anabólicos que desemboca en la pérdida del cartílago articular, la inflamación sinovial y cambios en el hueso subcondral.

La terapia celular basada en el uso de CMMs, tanto para trasplantes autólogos como alogénicos, es una de las estrategias actuales más prometedoras para el tratamiento de la artrosis. Las CMMs son capaces de autorenovarse, diferenciarse a múltiples linajes mesodérmicos como los condrocitos o los osteoblastos y secretar factores de crecimiento e inmunomodulación que afecten de manera paracrina al microambiente celular en el que se ubiquen.

Las CMMs, encargadas de la reparación tisular y la inmunomodulación, pueden presentar alteraciones génicas y/o moleculares que sean determinantes en la fisiopatología de las enfermedades crónicas y particularmente en la artrosis. El estudio de estas alteraciones, junto a la variación génica que pueda suponer su introducción en andamiajes biológicos, puede dar pistas clave de la fisiopatología de la enfermedad y de las formas específicas del uso de CMMs en andamiajes biológicos.

OBJETIVOS

Objetivo global

Estudiar las características genéticas de las CMMs obtenidas de la MO de pacientes con artrosis en comparación con las características genéticas de las CMMs de MO obtenidas de pacientes con fracturas subcapitales de cadera (grupo control).

Objetivos específicos

1. Analizar comparativamente la existencia de alteraciones en el perfil de expresión génica de las CMMs de pacientes artrósicos.
2. Analizar la susceptibilidad de desarrollar artrosis mediante el uso de polimorfismos de una sola base (SNPs) relacionados con las alteraciones génicas caracterizadas previamente en el perfil de expresión.
3. Determinar el efecto del uso de matrices en la expresión génica y secreción de factores de crecimiento y desarrollo en las CMMs relacionados con las alteraciones génicas caracterizadas previamente en el perfil de expresión

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental y sujetos de estudio

Se realizó un estudio de la expresión génica global de las CMMs de pacientes artrósicos y pacientes control de fractura subcapital.

Los genes expresados diferencialmente y con significación estadística se clasificaron en función de su función biológica para interpretar los datos de expresión, determinando cuál de las funciones era estadísticamente más significativa mediante Ontología Genética (GO). Es decir, determinar qué categorías funcionales eran las que comparativamente mostraban mayores disparidades de expresión y presumiblemente, por tanto, en la función biológica de las proteínas codificadas.

Posteriormente se analizaron los agrupamientos funcionales de genes (GSEA) en ambas muestras y se dividieron en dos categorías:

- La primera categoría englobaba genes pertenecientes a factores de crecimiento y diferenciación celular que tras los pertinentes análisis mostraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes artrósicos y el grupo de sujetos control.
- La segunda categoría englobaba genes en los que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes artrósicos y el grupo de sujetos control.

Por otro lado, se analizó el efecto del uso de matrices en la expresión génica y secreción de factores de crecimiento y desarrollo en las CMMs (Figura 9).

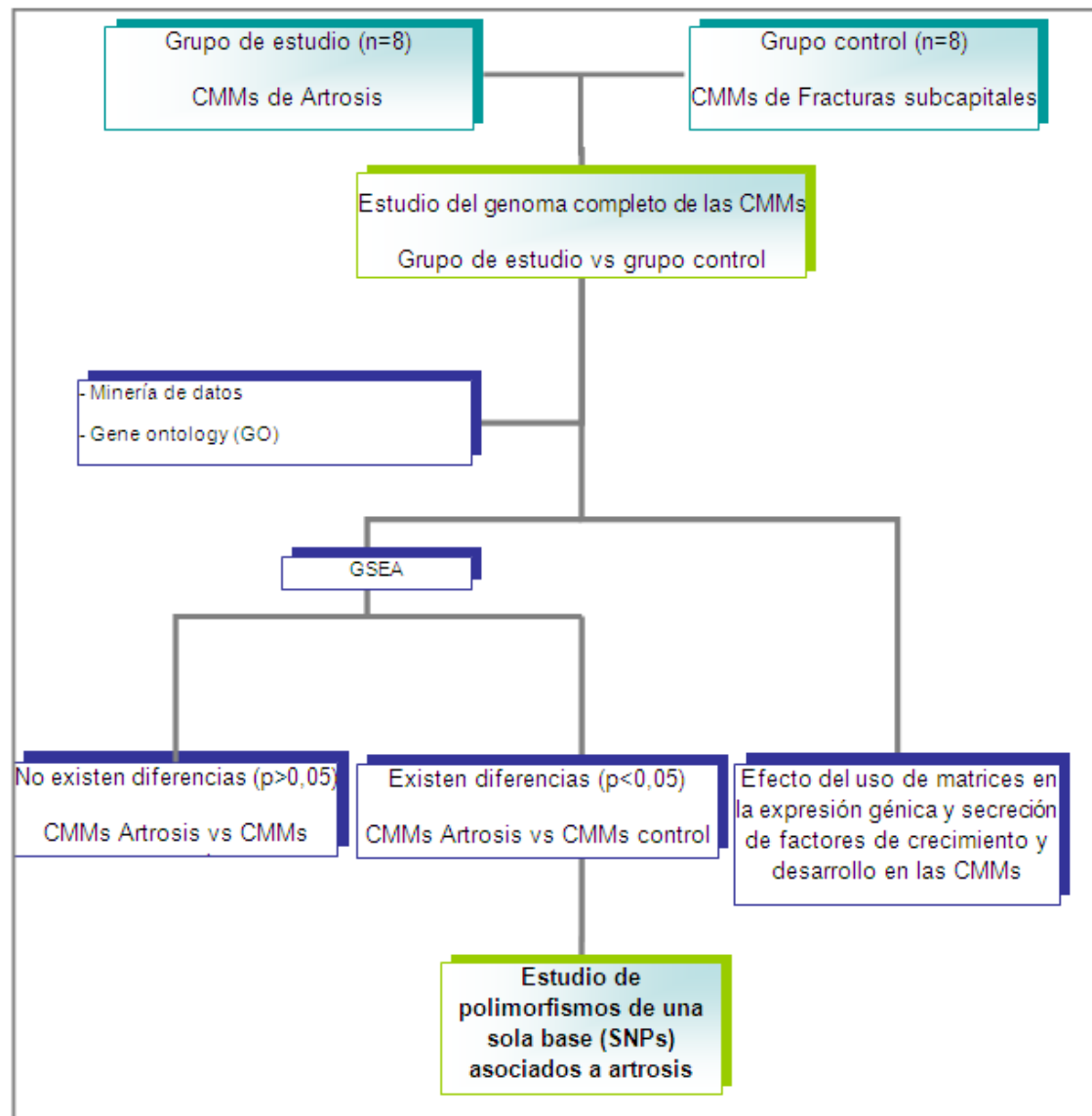


Figura 9. Esquema del diseño experimental del estudio.

2. Pacientes artrósicos

2.1. Selección de pacientes artrósicos

Debido a la diferente naturaleza de los estudios a realizar en este proyecto, se utilizaron diferentes cohortes de pacientes de artrosis, variando el tamaño muestral de las mismas debido a criterios estadísticos (apartado 15 de material y métodos), los pacientes se agruparon de la siguiente manera:

- Para el análisis del perfil de expresión del genoma completo de las CMMs de artrosis, se seleccionaron 8 pacientes con artrosis de rodilla del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, a los que se les iba a practicar una artroplastia total de rodilla en el Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica de dicho Hospital.
- Para el estudio de los SNP del *COL10A1* (n=190), se seleccionaron pacientes del área de salud 7 de Madrid que acudieron a las consultas de Reumatología y Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid
- Para el estudio de los niveles séricos de IGF1 y SNP del *IGF1* (n=594), se utilizaron 2 cohortes diferentes con el fin de conseguir una población de estudio representativa del territorio español. La primera cohorte (cohorte 1) fue la misma cohorte usada para los SNP de *COL10A1* (n=210) y la segunda cohorte (cohorte 2) (n=384) fue obtenida del Hospital Universitario de A Coruña, donde se seleccionaron pacientes con artrosis que acudieron tanto a consulta ordinaria de Reumatología o a causa de una operación de reemplazamiento articular de cadera o rodilla.

El estudio estaba aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos los pacientes incluidos facilitaron su consentimiento informado previamente a su ingreso en el estudio. Así mismo, se comprobó mediante la historia clínica que ningún paciente con artrosis presentaba antecedentes de ninguna otra enfermedad musculoesquelética.

2.2. Sujetos control

Los sujetos control no refirieron ningún antecedente o episodio clínico relacionado con enfermedades musculoesqueléticas. Se incluyeron en este grupo pacientes con fractura subcapital originada por traumatismo fuerte puesto que este tipo de fractura no es el más típico de la osteoporosis. Para comprobar la ausencia de osteoporosis en los pacientes seleccionados, se realizó una densitometría ósea (DMO). Los pacientes incluidos tenían un valor de $DMO > -2,5$, indicando ausencia de osteoporosis densitométrica. Al igual que en caso de los pacientes artrósicos, el número de sujetos

sanos incluidos en los diferentes objetivos estudiados en este proyecto, varió dependiendo del tamaño muestral requerido estadísticamente para cada uno de ellos.

- Para el análisis del genoma completo de las CMMs de artrosis, se seleccionaron 8 pacientes con fractura subcapital de cadera del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, a los cuales, se les iba a practicar una artroplastia total de cadera en el Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica de dicho Hospital.
- Para el estudio de los SNP del *COL10A1* (n=836), el estudio de los niveles séricos de IGF1 y SNP del *IGF1* (n=897), se seleccionaron pacientes con fractura subcapital de cadera del área de salud 7 de Madrid que acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y voluntarios sanos de la plantilla del propio Hospital.

Todos los sujetos control incluidos, dieron su consentimiento informado previamente a su ingreso en el estudio.

2.3. Datos epidemiológicos

Se recogieron datos epidemiológicos de los pacientes artrósicos incluidos en los diferentes estudios: sexo, edad, grado de artrosis (definido mediante la escala radiológica de Kellgren-Lawrence (KL)^[117]), historia de cirugías de reemplazamiento articular por artrosis y articulación/es afectadas por la patología. No presentaban patología concomitante autoinmune ni musculoesquelética

En el caso de los sujetos control, los datos que se recogieron fueron: edad y sexo. No presentaban patología concomitante autoinmune ni musculoesquelética.

3. Obtención de las CMMs de MO

3.1. *Obtención de MO*

Los aspirados de MO se obtuvieron del canal femoral y del plato tibial de los sujetos de estudio en el momento en que se les practicaba una cirugía de reemplazamiento articular.

3.2. *Aislamiento de las CMMs de MO*

Para el aislamiento de las CMMs de MO se siguió el siguiente protocolo: la MO se diluyó con 20 ml de medio de expansión de CMMs (LG-DMEM (low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium; *Gibco Invitrogen Paisely, Reino Unido*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos*), 2 mM de L-glutamina (*Sigma-Aldrich*) y antibióticos (0,02% de estreptomicina y 0,06% de penicilina; (*Sigma-Aldrich*) y se centrifugó a 380x g durante 5 minutos para sedimentar las células. Se resuspendió el botón celular en 5 mL de LG-DMEM (*Gibco*) y se depositaron sobre un gradiente de Percoll (*Sigma-Aldrich*) al 70% con cloruro sódico (NaCl) (*Sigma-Aldrich*) y tampón fosfato salino (PBS; *Sigma-Aldrich*), que se centrifugó a 500x g durante 15 minutos. La fracción de células de baja densidad se recogió, se lavó con LG-DMEM (*Gibco*) y se distribuyó en placas de cultivo (100 mm de diámetro) para su separación selectiva basada en la adherencia celular. Las CMMs se cultivaron en medio de expansión de CMMs a 37 °C en una atmósfera húmeda con 95% aire y 5% CO₂. Cada 3-4 días se cambió el medio de expansión de CMMs. Cuando las CMMs llegaron al 50-60% de confluencia, se despegaron con 0,25% tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Lonza, Verviers, Bélgica*) durante 5 minutos a 37°C. En este punto, las células se subcultivaron en proporción 1:2 hasta alcanzar el pase adecuado.

3.3. Caracterización de las CMMs de MO

3.3.1. Citometría de flujo

Para caracterizar a las células según los diferentes antígenos de superficie que presentaban, las CMMs subconfluentes en pase 6 se levantaron de las placas de cultivo, se lavaron dos veces con PBS a 240x g durante 10 minutos y se incubaron con los anticuerpos: anti CD73-aloficocianina (APC; *Miltenyi Biotec., Alemania*), anti CD90-ficoeritrina (PE; *Miltenyi*), anti CD105-APC (*Biolegend, San Diego, CA, Estados Unidos*), anti CD166-PE (*Beckman Coulter, Woerden, Países Bajos*) y anti CD45-aloficocianina, cianina 5 (PC5; *Beckman Coulter*), durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo y para eliminar el exceso de anticuerpo, las células se lavaron dos veces con PBS durante 10 minutos, se centrifugaron a 240x g y se fijaron con paraformaldehído 0,1 %. Las células se analizaron en el citómetro de flujo Gallios (*Beckman Coulter*) con su correspondiente software, AS07036.

3.3.2. Ensayos de diferenciación a linajes mesodérmicos

Las CMMs en pase 6, cultivadas en monocapa, con un 70-80% de confluencia, se incubaron durante 21 días, en tres medios de diferenciación diferentes, adipogénico, condrogénico y osteogénico, para evaluar la multipotencialidad de originar diferentes linajes mesodérmicos. En todos los casos, las CMMs diferenciadas se observaron en un microscopio óptico (LEICA DMI 4000 B; *Leica Microsystems, GmbH, Alemania*).

3.3.2.1. Ensayos de diferenciación osteogénica

Las CMMs se cultivaron en medio basal de diferenciación osteogénica de CMMs humanas suplementado con 30mg/mL de gentamicina (*Normon, Madrid, España*) y el kit de suplementos osteogénicos SingleQuots™ (*Lonza*), que contenía dexametasona, L-glutamina, ácido ascórbico, penicilina, estreptomycin, β -glicerolfosfato y factores de crecimiento para el crecimiento de CMMs (MCGS). El medio se renovó cada 3-4 días durante 21 días. A los 21 días de diferenciación, las células se tiñeron con rojo alizarina S (*Sigma-Aldrich*) para observar la matriz mineralizada que se había formado.

3.3.2.2. Ensayos de diferenciación condrogénica

Las CMMs se cultivaron en medio basal de diferenciación condrogénica suplementado con el kit de suplementos condrogénicos SingleQuots™ (*Lonza*), que contenía dexametasona, ácido ascórbico, el suplemento insulina-transferrina-selenio (ITS) en PBS, 30 mg/mL de gentamicina, 15 µg/mL de anfotericina, piruvato sódico, prolina y L-glutamina. El medio se cambió cada 3-4 días durante 21 días, añadiéndose 10 ng/ml TGFβ3 (*Lonza*) en cada cambio. A los 21 días de diferenciación, las células se tiñeron con azul de toluidina (*Sigma-Aldrich*) para observar los proteoglicanos de la matriz extracelular formada.

3.3.2.3. Ensayos de diferenciación adipogénica

Las CMMs se cultivaron en medio de inducción de adipogénesis (*Lonza*) suplementado con el kit de suplementos adipogénicos SingleQuots™ (*Lonza*), que contenía insulina recombinante humana, L-glutamina, MCGS, dexametasona, indometacina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 30 mg/mL de gentamicina y 15 µg/mL de anfotericina-B) y en medio de mantenimiento de adipogénesis (suplementado con el kit de suplementos adipogénicos SingleQuots™ (*Lonza*), que contenía insulina recombinante humana, L-glutamina, MCGS, 30 mg/mL de gentamicina y 15 µg/mL de anfotericina) durante tres ciclos. El medio se cambió cada 3-4 días durante 21 días, alternando siempre entre el medio de inducción de adipogénesis y el medio de mantenimiento de adipogénesis. A los 21 días de diferenciación, las células se tiñeron con Oil red O (*Sigma-Aldrich*) para observar las vacuolas lipídicas formadas en el interior de las células

4. Preparación de las esferas de alginato

Se preparó una solución con CMMs de MO en fase 3 en suero fisiológico a una concentración de 4 millones CMMs/mL. Esta solución se mezcló con 1,2% de alginato de baja viscosidad (*Keltone LV; Kelco, Surrey, Reino Unido*) previamente disuelto en suero fisiológico. La mezcla total se vertió goteando con una aguja de 23'' de calibre en tampón cloruro de calcio (CaCl_2) 102 mM, manteniendo un ritmo regular de gotas y la misma altura desde la aguja a la superficie del tampón. Para evitar la adhesión entre las esferas de alginato que se iban formando, el recipiente que contenía el tampón CaCl_2 102M se agitó suavemente a intervalos regulares. Después de 10 minutos, las esferas de alginato se lavaron 2 veces con suero fisiológico y una vez con medio de expansión de CMMs.

5. Ensayos de inmunomodulación

Las CMMs, embebidas en alginato o cultivadas en monocapa, se preconditionaron durante 48 horas en LG-DMEM (*Gibco*) suplementado con 2% FBS (*Sigma-Aldrich*), 0,02% de estreptomicina (*Sigma-Aldrich*) y 0,06% de penicilina (*Sigma-Aldrich*), para homogeneizar el estado metabólico de las células. Posteriormente, se incubaron durante 24 horas en medio de expansión de CMMs o en medio proinflamatorio (que consistió en medio de expansión de CMMs suplementado con 50 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ y 50 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ (*ambos de PeproTech, Londres, Reino Unido*) para activar sus propiedades inmunomoduladoras.

Para evaluar si las propiedades inmunomoduladoras de las CMMs podían ser activadas en cultivos celulares a largo plazo, CMMs embebidas en alginato se cultivaron durante 30 días en medio de expansión de CMMs. Después del periodo de cultivo, se incubaron durante 24 horas en medio de expansión de CMMs o en medio proinflamatorio.

Las placas que contuvieron las CMMs incluidas en alginato, se cubrieron con agarosa al 3% para evitar el trasvase celular y crecimiento fuera de la bola de alginato.

6. Ensayo de supervivencia celular en alginato medida en cantidad de ADN

La supervivencia celular en las esferas de alginato, medida en cantidad de ADN (μg), se evaluó a diferentes tiempos: 0, 7, 14, 21 y 30 días. Triplicados de cada punto de tiempo se digirieron durante una noche a 56°C con tampón papaína (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ papaína (*Sigma-Aldrich*), 50 mM EDTA (*Sigma-Aldrich*) y 5mM l-cisteína hidroclorehídrico (*Sigma-Aldrich*). Se añadió bromuro de etidio a la mezcla de reacción. La cantidad de ADN se midió fluorimétricamente en un lector Wallac 1420 VICTOR²™ (*Perkin-Elmer, Wellesley, MA*), midiendo la extinción a 340 nm y la emisión a 590 nm. Se utilizó como estándar ADN de timo de ternero^[118].

7. Obtención de las muestras de sangre y suero

7.1. Extracción de sangre

La toma de sangre se realizó por el sistema de vacío Vacutainer (BD, *Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA*). Se extrajeron dos tubos por paciente: un tubo de 10 mL con EDTA (BD 367525; *Becton-Dickinson*), que se utilizó para la extracción posterior de ADN, y un tubo seco de 7 mL (BD 367615; *Becton-Dickinson*), para la obtención de suero.

7.2. Obtención de suero

Para la obtención del suero, el tubo seco, se incubó entre 20-30 minutos a temperatura ambiente para favorecer la coagulación. Tras este tiempo, el tubo se centrifugó 1500x g durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante (suero). Las alícuotas de suero se guardaron a -80°C hasta su uso.

8. Extracción de ARN y transcripción inversa (RT)

8.1. Extracción de ARN

El ARN total fue extraído de las CMMs de MO, utilizando el kit QIAamp RNA Kit (*Qiagen, Germantown, MD*) Todas las células, en pase 3, estaban conservadas a -80°C en RNAlater™ (*Qiagen*) para estabilizar el ARN celular y evitar su degradación. Para extraer el ARN total, se centrifugaron a 12000x g durante 5 minutos, se recogió el precipitado celular y se añadió tampón RLT suplementado con 10 µl/mL de β-mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*), centrifugándose esta mezcla en una columna QIAshredder (*Qiagen*) para lisar las células. Al volumen eluído se le añadió un volumen igual de etanol al 70% y se centrifugó en una columna de centrifugación RNeasy a 10000x g durante 1 minuto. En este caso, el volumen eluído fue descartado, recuperando la fracción de muestra retenida en la columna, que contenía el ARN. El ARN se lavó con el tampón RW1. Se incubó con DNase I (diluida previamente en tampón RDD) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Y se hicieron lavados progresivos con RW1 y RPE a 10000x g durante 1 minuto. El ARN total se eluyó en 60 µl de agua libre de ARNasa a 12000x g durante 1 minuto y se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (*NanoDrop technologies, Inc., Wilmington, DE*).

8.2. RT de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADNc se obtuvo usando el Kit Transcriptor first strand cDNA synthesis (*Roche Diagnostics, S.L. Barcelona, España*). Previamente a la RT, se digirieron las muestras con ADNasa libre de ARNasa (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos*) durante 15 minutos a 70°C para eliminar cualquier contaminación por ADN. El RNA se mezcló con 60 µM de hexámeros al azar y agua libre de ARNasas homogeneizándose. Se le añadió la solución de reacción, que consistió en tampón de reacción a una concentración de 8 mM MgCl₂, 20U de inhibidor de ARNasas, 1 mM de mezcla de desoxinucleótidos y 10 U de transcriptasa inversa. La reacción de RT se incubó 10 minutos a 25°C, 1 hora a 50°C y 5 minutos a 85°C para inactivar la reacción. Como control negativo de la reacción se preparó un tubo siguiendo el protocolo anterior excepto que se añadió agua libre de ARNasas en lugar de la enzima de transcripción inversa. Se añadió agua libre

de ARNasas para obtener la concentración de ADNc adecuada y se guardó a -80°C hasta su uso.

9. Aislamiento de ADN

El ADN se extrajo de la sangre de los pacientes de las Cohortes 1 y 2, así como de sujetos sanos, usando columnas Qiagen (*Qiagen*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se mezcló la sangre recogida con Qiagen proteasa en proporción 10:1. Se añadió un volumen de tampón AL igual al volumen de sangre utilizado y se incubó a 56°C durante 22 minutos. Tras este tiempo, se añadió a la mezcla un volumen de etanol 100%, la solución resultante se centrifugó en una columna QIAmp DNA a $8000\times g$ durante 1 minuto. El ADN retenido en la columna, se lavó progresivamente con los tampones AW1 y AW2 para conseguir un rendimiento de este ácido nucleico más puro. Finalmente el ADN se eluyó en $30\text{ }\mu\text{L}$ de tampón AE durante 1 minuto a $12000\times g$ y se cuantificó espectrofotométricamente (NanoDrop ND1000; *NanoDrop technologies, Inc., Wilmington, DE*)

10. DNA microarray

10.1. Hibridación

Se extrajo el ARN de las CMMs en fase 3 tal como se indica en el apartado 8.1. Se usó el Protocolo One-color Microarray basado en el Análisis de Expresión génica (*Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos*) para amplificar y marcar el ARN. $1\text{ }\mu\text{g}$ del ARN total se transcribió reversamente con el primer del promotor T7 y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). El ADNc se transformó en ARN antisentido (ARNa) usando la ARN polimerasa T7, que es capaz de amplificar su diana e incorporar el marcaje de cianina 3 (Cy3) y cianina 5 (Cy5) simultáneamente. Las muestras que contenían $1,65\text{ }\mu\text{g}$ de ARNa marcado con Cy3 y Cy5, se hibridaron en el chip de microarray Agilent Whole Human Genome MicroarrayKit 4 x 44K (G4112F, *Agilent Technologies*), que contenía 41.000 transcritos

y genes únicos para humanos, durante 17 horas a 65°C y 10 rpm, en un horno de hibridación Agilent (G2545A, *Agilent Technologies*) con el tampón de hibridación HI-RPM (*Agilent Technologies*). Los arrays se lavaron y secaron por centrifugación.

10.2. Obtención de datos

Los arrays se escanearon con una resolución de 5 μm de resolución en el escáner Agilent DNA MicroarrayG2565BA (*Agilent Technologies*), usando las posiciones definidas por defecto en el formato 4 x 44K de arrays.

10.3. Análisis de datos e imágenes

Estos datos se analizaron en R (R Development Core Team) usando paquetes del proyecto Bioconductor *Agi4x44PreProcess*^[27], así como rutinas de R escritas por el usuario. Las opciones de *Agi4x44PreProcess* que se definieron fueron *MeanSignal* y *BGMedianSignal* como señal principal y señal de fondo, respectivamente. Los datos de fondo se corrigieron y normalizaron entre arrays usando los métodos medio y cuantiles. Primero se usó el método medio, que origina una señal de fondo positiva corregida al extraer la señal de fondo de la señal principal. Después se utilizó el método de los cantiles para normalizar los datos entre arrays^[119, 120]. Se añadió una constante igual a 50 a las intensidades antes de aplicar el logaritmo de transformación para atenuar los log ratios a cero en las intensidades más bajas y así reducir la variabilidad de estas señales.

Para los análisis de imagen y la obtención de datos se usó el software de análisis de imagen *Agilent Feature Extracción*, versión 9.1.3.1 (AFE). Este programa identifica cada sonda con las diferentes propiedades de cuantificación de la señal. Las sondas pueden caracterizarse mediante filtros: datos control, datos fuera del rango dinámico del escáner o valores extremos. Se fijó el rango dinámico del escáner en 3 y se procedió con los siguientes filtros: señales indistinguibles de fondo, señales encontradas y señales no saturadas. Para cada uno de los filtros, se demandó que las sondas tuvieran al menos $\geq 75\%$ de sus réplicas en una condición experimental con un dato de cuantificación, ya que esto indicaba que se encontraba

en el rango dinámico. Por cada réplica a través de todo el juego de muestras, se descartaron las sondas que tuvieran más del 25% de sus réplicas en al menos una condición experimental con un filtro que indicará valores fuera de rango. Por otro lado, este tipo de chips, contienen un juego de sondas control que se replican hasta 10 veces sobre el chip, permitiendo medir la reproducibilidad del chip en términos de coeficiente de variación. Agi4x44PreProcess, registra la mediana de las intensidades de todos los juegos de sondas replicados.

11. Genotipado de SNPs mediante sondas Taqman

La mezcla para laPCR se preparó con dos sondas complementarias a cada alelo del polimorfismo en estudio; estas sondas estaban marcadas en su extremo 5' con fluoróforos distintos. En el extremo 3' llevaban una molécula (*quencher*) que absorbía la energía emitida por el fluoróforo gracias a un fenómeno de resonancia. La sonda se unía a su amplicón correspondiente y durante la fase de anillamiento era degradada por la ADN polimerasa gracias a su actividad 5' exonucleasa, lo que daba lugar a la liberación del fluorocromo. Para la detección de la fluorescencia se usó el equipo 7900HT Fast Real-Time polymerase chain reaction system (*Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos*), usándose la opción de “marcado agresivo” en el software Haploview con un umbral de r^2 de 0,8 y una frecuencia mínima del alelo menor de 0,1.

11.1. *COL10A1*

Se seleccionaron tres SNPs para cubrir la mayor variabilidad de una región cercana al gen (localizado en la región 6q22.1 del cromosoma y que se extiende aproximadamente 7kb) de 17 kb. Los SNPs (rs4945551, rs11965969, rs1931897) se genotiparon por un ensayo comercial (*Applied Biosystems*). Se mezclaron 5 ng de ADN con 2 μ l de TaqMan Universal PCR mastermix para cada uno de estos SNPs, y se siguió el siguiente programa en el termociclador: un paso inicial de 10 minutos a 92°C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 92°C y 1 minuto a 57°C. Todos los polimorfismos se ajustaron a las proporciones de Hardy-Weinberg en la muestra control.

11.2. IGF1

Se seleccionó el SNP rs35767, localizado en la región 12q23.2, debido a que se encuentra en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo en el promotor del gen de *IGF1* de 192 pares de bases (pb) con secuencias repetidas CA involucrado en la variación de niveles de expresión séricos de *IGF1*^[121]. El SNP rs35767 puede actuar como un marcador del polimorfismo de 192 pb que se encuentra en un microsatélite y que por tanto es más difícil de estudiar técnicamente. Para el genotipado de este SNP se siguió el mismo procedimiento que para el *COL10A1* (punto 11.1), pero en este caso se usó la mezcla de reacción TaqMan Universal PCR mastermix (*Applied Biosystems*) para este SNP.

12. PCR cuantitativa a tiempo real del ADNc

12.1. RT-PCR COL10A1

Se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real del *COL10A1* con Taqman Gene Expression Assay ID Hs00166657 (*Applied Biosystems*) en el equipo Mastercycler® PCR Cycler (*Eppendorf, AG, Hamburg, Alemania*). Los resultados de la expresión transcripcional del *COL10A1* se normalizaron usando el gen (*Eurogentec, Liege, Bélgica*) de β -actina (*ACTB*). Para la cuantificación relativa final de la expresión, a cada muestra de ARN se le asignó un valor ΔC_t , C_t (para *COL10A1*) menos C_t (*ACTB*). Se normalizaron los resultados de acuerdo a muestras de ARN estándar, extraídas del mismo número de individuos sanos y ensayadas en paralelo. A estos controles se les asignó un ratio de normalización (NR) de 1, y el NR de cada muestra experimental fue calculado de la fórmula: $NR_{exp} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $-\Delta\Delta C_t$ fue ΔC_t experimental menos ΔC_t estándar. Se Estados Unidosron controles “No RT” para asegurar la ausencia de trazas de DNA genómico.

12.2. Estudio de inmunomodulación

En este caso el análisis se realizó con el termociclador ABI7000 (*Applied Biosystems*). La cuantificación relativa final se calculó de la misma manera que para el *COL10A1* (apartado 12.1 de materiales y métodos). Los valores de Ct se normalizaron teniendo en cuenta la media de Ct de tres genes constitutivos (BKI): gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*; *Eurogentec, Liege, Bélgica*), la ubiquitina C (*UBC*; *Eurogentec*) y la hipoxantina fosforibosiltransferasa (*HPRT*; *Eurogentec*). Los genes seleccionados fueron: *IL6* (*Eurogentec*), inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (*TIMP1*; *Eurogentec, Liege, Bélgica*) y *TIMP2* (*Eurogentec, Liege, Bélgica*), *VEGF* (*Eurogentec, Liege, Bélgica*), *TGFβ1* (*Eurogentec*) e *IDO* (en la que se usó el ensayo bajo demanda Hs00158027.m1; *Applied Biosystems, Capelle a/d IJssel, Países Bajos*).

Tabla II. Secuencias de los primers usados

GEN	Sentido 3' → 5'	Antisentido 5' → 3'
<i>GAPDH</i>	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	TAAAAGCAGCCCTGGTGACC
<i>UBC</i>	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	TGCCTTGACATTCTCGATGGT
<i>HPRT</i>	TATGGACAGGACTGAACGTCTTG	CACACAGAGGGCTACAATGTG
<i>IL6</i>	TCGAGCCCACCGGGAACGAA	GCAGGGAAGGCAGCAGGCAA
<i>TIMP1</i>	TGCCGCATCGCCGAGAT	ATGGTGGGTTCTCTGGTG
<i>TIMP2</i>	ATGGTGGGTTCTCTGGTG	CGGTACCACGCACAGGA
<i>VEGF</i>	GAGTGCCCACTGAGG	GCCTCGGCTTGTCAC
<i>TGFβ1</i>	GTGACAGCAGGGATAACACACTG	CATGAATGGTGGCCAGGTC

13. Ensayo de inmunabsorción ligado a enzimas (ELISA)

13.1. ELISA de IGF1

Los niveles de IGF1 se cuantificaron en sueros de pacientes artrósicos y sueros de pacientes con fractura subcapital con el Kit RayBio® de ELISA para IGF1 humano (*RayBiotech Inc. Norcross, GA, Estados Unidos*). Para liberar el IGF1 de sus proteínas de unión el suero tuvo que pretratarse antes de proceder al ensayo de ELISA. 30 µL de suero se mezclaron mediante vórtex con 120 µL de una solución de etanol ácido y se

incubó 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se centrifugó 5 minutos a 5000 g. 100 µL de sobrenadante se mezclaron con 200 µL de tampón Tris (pH=7,6) y se añadieron a 300 µL del diluyente A (*RayBiotech*), consiguiendo una mezcla homogénea. Se procedió inmediatamente al ensayo de ELISA: Se añadieron 100 µL del estándar o la muestra a cada pocillo y se incubó durante 2,5 horas a temperatura ambiente. La reacción se mezcló con 100µL de biotina y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µL de solución de streptavidina y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente. 100 µL de TMB One-Step Substrate Reagent (*RayBiotech*) se diluyeron en la reacción, que se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 50 µL de Solución Stop (*RayBiotech*). La densidad óptica se midió espectrofotométricamente a 450 nm y 550 nm (BioPhotometer Plus spectrophotometer; *Eppendor*,).

13.2. ELISA de IL6 y TIMP2

Los niveles de IL6 y TIMP2 se midieron en medios de cultivo de CMMs cultivadas en medio de expansión de CMMs o medio proinflamatorio mediante un Kit de ELISA para IL6 o el Kit de ELISA para TIMP2 (ambos de *R&D systems, Abingdon, Reino Unido*). Ambos factores se corrigieron por la cantidad de IL6 o TIMP2 en los medios de cultivo control. Se añadieron 100 µL de tampón RD1W (*R&D*) a 50 µL de muestra o estándar. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Se lavó cada pocillo 4 veces con tampón de lavado. Se añadió 200 µL de solución conjugada de TIMP2 o IL6 y se incubó 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 4 veces con tampón de lavado y se añadió 200 µL de solución de sustrato, protegiendo la reacción de la luz.

Finalmente se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar la reacción se añadió 50 µL de la solución Stop (*R&D*) y se cuantificó la placa a 450 nm - 540 nm en los 30 minutos siguientes a la finalización del ensayo.

14. Ensayo de cuantificación de IDO

La actividad enzimática de IDO se midió en el sobrenadante de los medios de cultivo de las CMMs como los niveles de su metabolito, kinenurina. 100µL al 30% de ácido tricloroacético (*Sigma-Aldrich*), se diluyeron 200µL de sobrenadante procedente

de medios de cultivo de CMMs, y se incubaron a 50°C durante 30 minutos. Se centrifugaron a 10000 x g durante 5 minutos y se añadió al sobrenadante un volumen igual de reactivo de Ehrlich (100 mg P-dimetilbenzaldehído y 5 mL de ácido acético glacial; *Sigma-Aldrich*). La densidad óptica se midió espectrofotométricamente a 490 nm en un BioPhotometer Plus spectrophotometer (*Eppendorf*).

15. Análisis estadístico

Se utilizó el programa informático GraphPad Prism Versión 5.0 (*San Diego, CA, Estados Unidos*) para la estadística descriptiva general y para el análisis comparativo de los datos obtenidos en este trabajo, así como el programa informático SPSS Versión 17.0.2; (*SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos*), para los análisis de regresión logística binaria. Los valores con una p menor de 0,05 se consideraron significativos.

Las distribuciones genotípicas y alélicas de los pacientes y controles se analizaron mediante el test de chi-cuadrado o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. Las asociaciones se estimaron mediante odds ratio (OR) con un intervalo de confianza (CI) del 95%. En los casos necesarios y para ajustar el efecto de los alelos analizados, se realizó un análisis de regresión logística binaria, usando el test de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow test con el estadístico de Wald.

Con el fin de organizar en rangos los genes de cada juego génico, se procesaron los datos obtenidos como variables ordinales usando el test t de Student. En el caso de variables con una distribución de datos gaussiana se utilizó el test t de Student. En el caso de las variables sin una distribución de datos gaussiana, se utilizó el test de Mann Whitney y en aquellas variables con más de dos grupos de estudio, se eligió el test de ANOVA (Univariate Analysis of Variance) con la corrección de Tukey para analizar los datos.

RESULTADOS

1. Caracterización de los sujetos de estudio

Las características de los 596 pacientes artrósicos y los 897 sujetos control se muestran en la tabla I. Para los análisis posteriores (transcriptómica, SNPs, inmunomodulación) se escogieron muestras representativas de los grupos de estudio analizados en cada caso. Las fracturas subcapitales usadas en los análisis de transcriptómica de las CMMs se utilizaron como grupo control de artrosis.

En el análisis de los sujetos de estudio, se encontró que el grupo de sujetos control era más joven que el de pacientes artrósicos y tenía un mayor número de pacientes de sexo masculino. Por otro lado, ambos grupos de pacientes artrósicos, independientemente de su procedencia, presentaban tendencias similares, por lo que los resultados posteriores se muestran como un conjunto de ambos grupos.

En una caracterización más detallada de los pacientes artrósicos, se observaron diferencias dependientes del sexo. El porcentaje de hombres artrósicos que se habían sometido a una cirugía de reemplazamiento articular, tanto de rodilla como de cadera, era más elevado que el porcentaje de mujeres artrósicas con prótesis articular. Sin embargo no se encontraron registros de cirugías de reemplazamiento articular en el subgrupo artrósico de sexo masculino, cuando ambas articulaciones estaban afectadas por la patología. No obstante, este incremento de cirugías en pacientes artrósicos de sexo masculino, fue consistente con el aumento del grado radiológico de artrosis según la escala radiológica de KL en este subgrupo de estudio.

Por último, para cuantificar la discapacidad presentada por los pacientes artrósicos se utilizaron tres cuestionarios de evaluación: el índice de artritis de las Universidades Western Ontario y McMaster (WOMAC), el índice algofuncional de LEQUESNE y el cuestionario de evaluación de la salud (HAQ). Mientras que los datos obtenidos de la escala de WOMAC fueron independientes del sexo de los pacientes, el índice de LEQUESNE y el cuestionario HAQ fueron dependientes del sexo de los pacientes y registraron valores más elevados en el subgrupo de pacientes artrósicos de sexo femenino.

Tabla III. Características de los pacientes de estudio.

Características		Pacientes			Controles
		Total	Coruña	Madrid	
Sujetos (n)		596	385	211	897
Mujeres, n (%)		424 (71.1)	259 (67.3)	165 (78.2)	518 (58)
Edad en el momento de obtención de la muestra, años (media \pm SD)		69.9 (9.0)	68.3 (9.4)	72.6 (7.5)	43.8 (17.7)
Articulación artrósica, n (%)	Rodilla	392 (43.7)	236 (26.3)	155 (17.3)	–
	Cadera	157 (17.5)	119 (13.3)	38 (4.2)	–
	Ambas	45 (5.0)	28 (3.1)	17 (1.9)	–
Cirugía de reemplazamiento articular, n (%)	Rodilla	131 (22.0)	100 (26.0)	31 (14.7)	–
	Cadera	133 (22.3)	118 (30.6)	15 (7.1)	–
	Ambas	18 (3.0)	2 (0.5)	4 (1.9)	–
Escala KL, n (%)	I	8 (1.3)	0 (0.0)	8 (3.8)	–
	II	68 (11.4)	29 (7.5)	39 (18.5)	–
	III	131 (22.0)	55 (14.3)	76 (36.0)	–
	IV	344 (57.7)	283 (73.5)	61 (28.9)	–
WOMAC, media (SD)	Dolor	–	–	7.1 (3.7)	–
	Rigidez	–	–	2.7 (1.6)	–
	Funcionalidad	–	–	32.3 (13.3)	–
LEQUESNE, media (SD)	Rodilla	–	–	10.8 (4.0)	–
	Cadera	–	–	10.8 (4.1)	–
HAQ, media (SD)		–	–	1.0 (0.5)	–

2. Caracterización de las CMMs de la MO y estudio de los marcadores de superficie.

La caracterización fenotípica mediante marcadores de superficie y tinción histológica, reveló que las células aisladas a partir de la MO de los pacientes y crecidas en cultivo, poseían adherencia a plástico (Figura 10). No se apreciaron diferencias fenotípicas entre las CMMs de pacientes artrósicos y las CMMs de los sujetos con fractura subcapital de cadera.

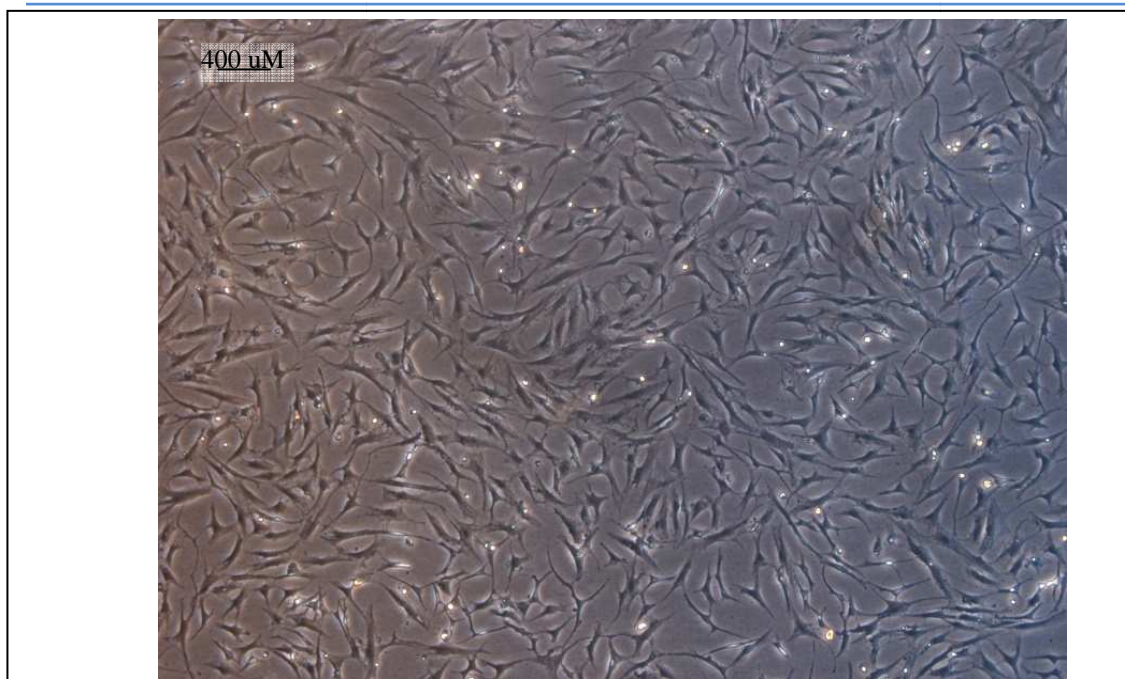


Figura 10. CMMs adheridas y expandidas hasta pase 6.

2.1. Marcadores de superficie de las CMMs

Tras la expansión, un alto porcentaje de CMMs conservaban los marcadores de superficie típicos de CMMs: CD90 (88,7%), CD73 (93,9%), CD166 (93,2%) y CD105 (87,2%) y una mínima proporción de CD45 (3,7%), marcador de células hematopoyéticas (Figura 11). Estos resultados indicaban un enriquecimiento en CMMs de más de un 95%, en función del bajo número de células que poseían marcaje para CD45.

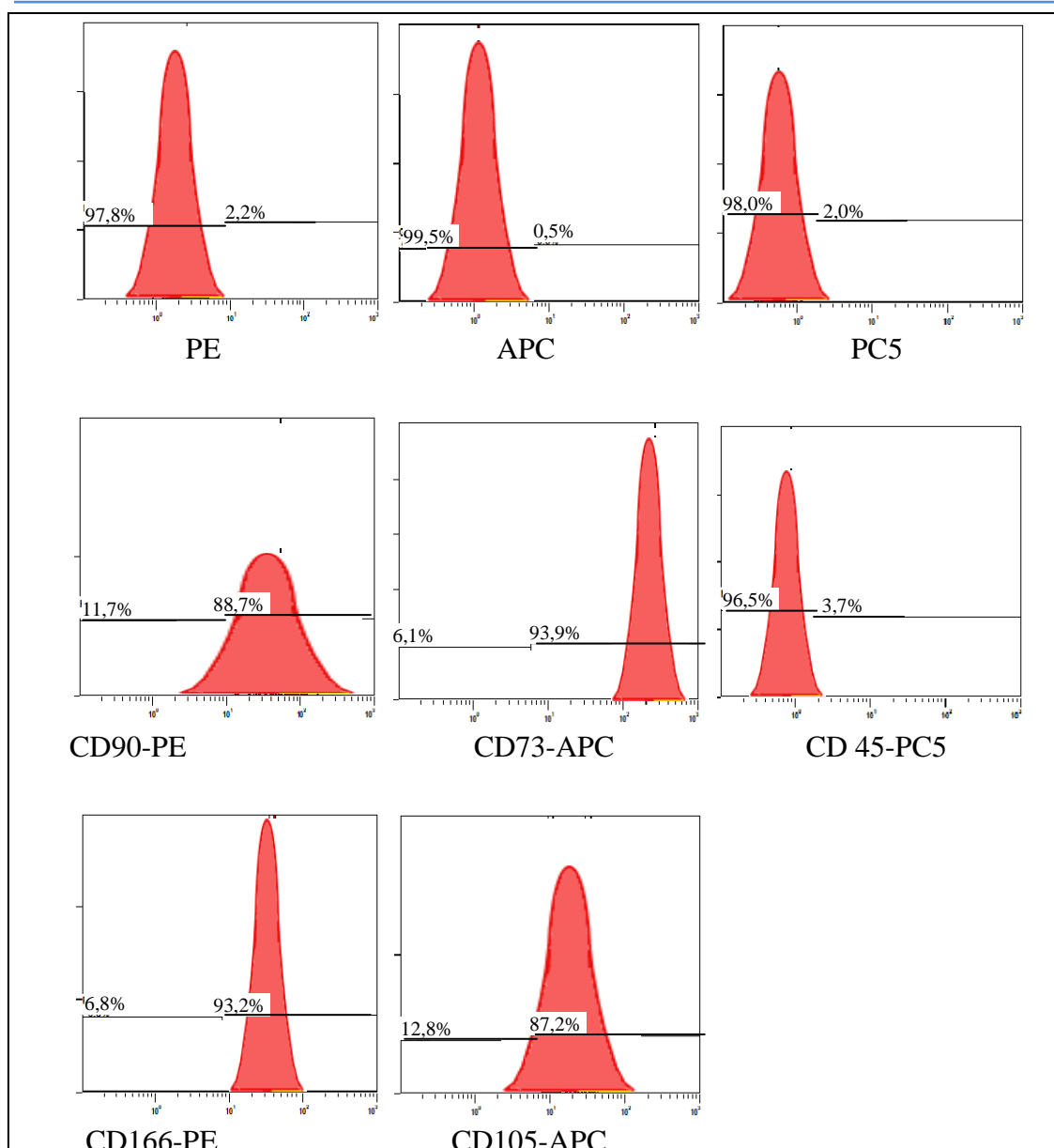


Figura 11. Citometría de flujo de las CMMs tras ser expandidas hasta pase 6. Datos expresados en valores medios (%) de los sujetos analizados.

2.2. Ensayos de diferenciación

Para estudiar la capacidad de diferenciación de las CMMs a los tres linajes (osteogénico, adipogénico, condrogénico) se trataron a las CMMs con suplementos específicos durante 21 días de cultivo. Como indica la tinción osteogénica con rojo alizarin (Figura 12 A) se observaron depósitos ricos en calcio. En cuanto a la diferenciación adipogénica (Figura 12 B) se observó tras la tinción con Oil red la aparición de vacuolas lípidicas intracelulares teñidas. Finalmente en la Figura 12 C se

muestran proteoglicanos de la matriz extracelular teñidos de color morado, indicativo de la diferenciación condrogénica.

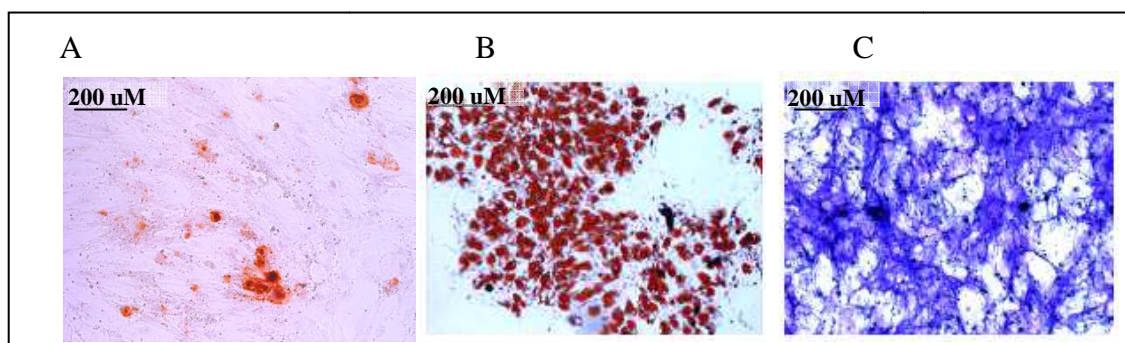


Figura 12. Ensayos de diferenciación de las CMMs en pase 6 durante 21 días (100x). A) Osteogénesis. B) Adipogénesis. C) Condrogénesis.

3. Comparación del perfil de expresión génica de las CMMs

Para determinar si la expresión génica global de las CMMs difería entre pacientes artrósicos y controles, se realizó un estudio comparativo entre ambos grupos de sujetos, mediante un microarray de ADN. En el análisis diferencial de la expresión, se consideraron exclusivamente aquellos genes cuyos cambios en la expresión (“Fold Change”) entre los sujetos artrósicos y controles, eran estadísticamente significativos e iguales o mayores de dos.

De un total de 21.255 transcritos analizados, 1.967 estaban expresados diferencialmente entre las CMMs de artrosis y las CMMs control con un nivel de significación $p < 0,05$. Entre éstos, 532 transcritos (aproximadamente un 25% del total de genes analizado); Entre estos, 240 (45%) estaban regulados y los 292 transcritos restantes (55%) se encontraban regulados a la baja en las CMMs de artrosis (Figura 13). Además, 40 de los transcritos regulados a la baja y 21 de los transcritos sobrerregulados mostraban diferencias en los niveles de expresión mayores de 5 veces. La mayoría de los genes estadísticamente significativos se agrupaban en las categorías funcionales relativas a la transducción de señales y de desarrollo, incluyendo la infrarregulación en las CMMs de origen artrósico de los genes codificantes de Hox- B3, -C12, -DLX2, -B4, -C13, -SIX6, y genes relacionados con estatura pequeña y con la ruta de la WNT/ β -catenina tales como *SFRP2*, *RUNX3*, *BARX* homeobox 1 (*BARX1*), R-Spondina

(*RSPO*) 2, *RSPO3*, osteopontina (*SPPI*) y el antagonista dapper de la β -catenina 1 (*DACT1*).

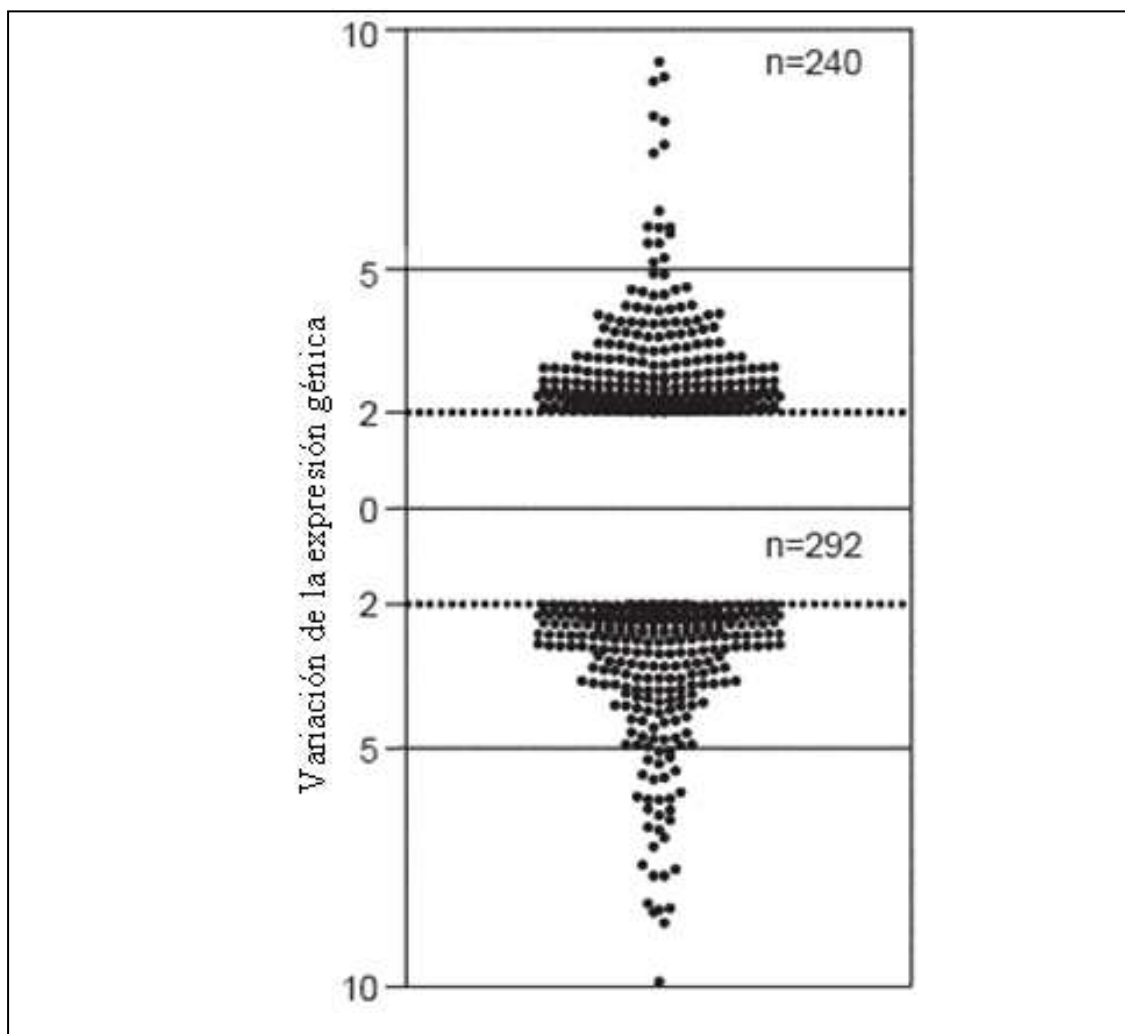


Figura 13. Expresión génica diferencial en células madre mesenquimales de artrosis. Variación de la expresión génica. El eje y representa la distribución de los niveles de expresión génica los niveles sobrerregulados e infraregulados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en CMMs de artrosis. Por utilidad gráfica, los datos fuera de los límites del eje no están representados.

3.1 *Análisis de GO*

A pesar de los múltiples filtrados previos, la cantidad de genes significativos obtenidos era demasiado extensa para extrapolar la importancia biológica de estas diferencias. Para poder manejar mejor la información e integrar los perfiles de expresión, realizamos una clasificación basada en la ontología génica o GO (Gene Ontology). Su fundamento consiste en una clasificación jerárquica y estructurada en torno a tres categorías o anotaciones fundamentales: el proceso biológico (BP, Biological Process), el componente celular (CC; Cellular Component) y la función molecular (MF; Molecular Function).

Esta clasificación en anotaciones GO, se realizó de manera no supervisada y utilizando la herramienta bioinformática GeneCodis 2.0^[122, 123]. Los resultados obtenidos, mostraron que 457 genes del listado inicial de 532 podían ser reagrupados en categorías próximas, no así los 75 de 532 restantes. Una visión general de los resultados indicó que los genes de transducción de señales (45 genes), desarrollo (44 genes), diferenciación (22 genes), señalización célula-célula (15 genes) y proliferación celular (14 genes) se encontraban entre las 5 anotaciones correspondientes a procesos biológicos más enriquecidas en el análisis diferencial entre pacientes artrósicos y sujetos sanos. Además, la clasificación de los genes en función de la categoría “Componentes Celular”, mostró que las anotaciones más representadas se relacionaban con el citoplasma, la región extracelular y las proteínas integrantes de la membrana celular. Por último, y respecto a la función biológica de los genes, se encontró que 23 de 45 genes pertenecientes al “término” señales de transducción y 29 de 44 con el “término” desarrollo, estaban drásticamente infra regulados en pacientes artrósicos. La Figura 14 muestra el número de genes sobre regulados e infra regulados de cada anotación (Figura 14 A) así como la variación en su expresión (Figura 14 B). Estos resultados sugerían que la menor expresión génica en CMMs de artrosis, se concentraba dentro de las categorías relativas a factores de transducción y de señales y moléculas involucradas en el desarrollo.

Adicionalmente y tras un análisis, esta vez supervisado, de genes “específicos” y estadísticamente significativos, se encontró que los colágenos, pertenecientes a la

categoría GO de componentes celulares de la región extracelular, estaban infraregulados en CMMs de artrosis para *COL4A1*, *COL4A2*, *COL8A1*, *COL11A1* y, en particular *COL10A1*.

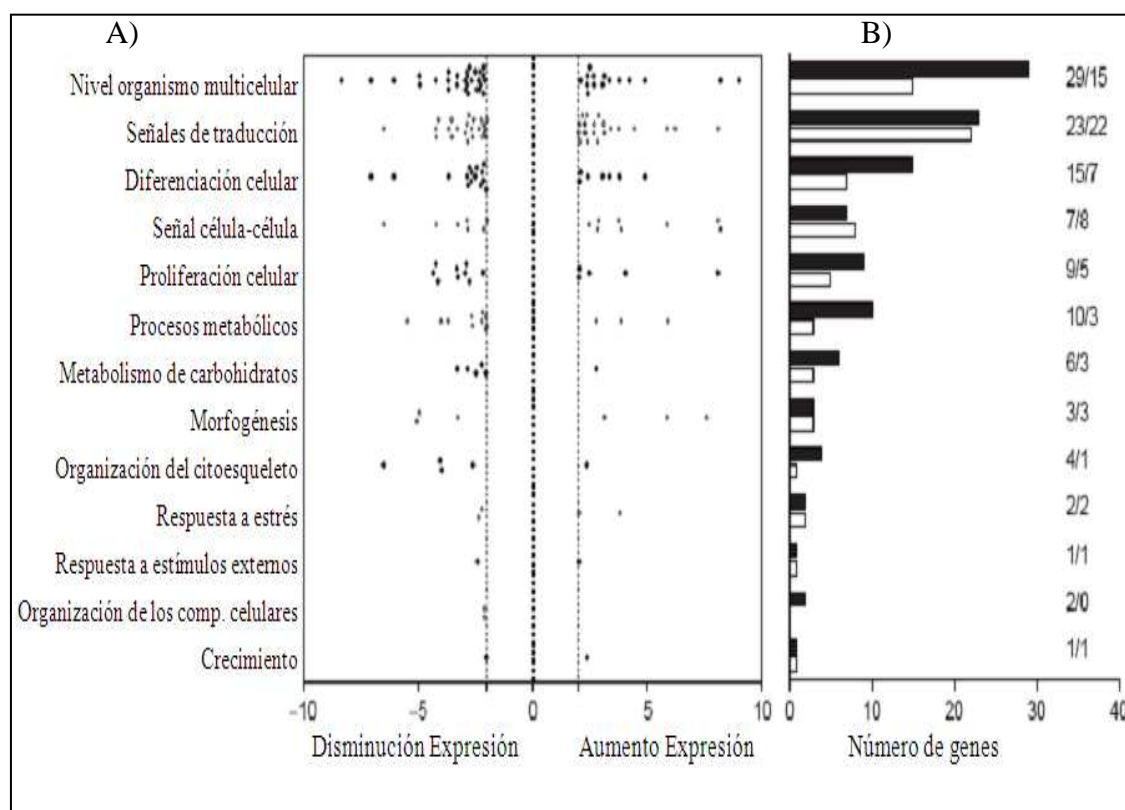


Figura 14. Expresión diferencial de genes en células madre mesenquimales de artrosis de acuerdo a las categorías de GO. (A) El eje y representa genes individuales clasificados de acuerdo a estrechas categorías GO proporcionadas por el análisis GeneCodis2. El eje x representa múltiple variación en la expresión de CMMs de artrosis comparada con sujetos control ($p < 0,05$). Sólo los genes expresados al menos con una diferencia de dos veces su expresión se consideraron para el análisis. Los datos fuera del límites del eje no están representados por utilidad grafica. (B) El gráfico de barras muestra el número de genes sobrerregulados (barras blancas) e infraregulados (barras negras) en cada categoría representada en (A).

3.2 GSEA

Para evaluar si algún grupo o conjunto de genes, con funciones biológicas comunes, definido *a priori* mostraba diferencias estadísticamente significativas, y concordantes entre dos estados biológicos, se realizó un GSEA^[124] El propósito de este análisis es determinar si existe un enriquecimiento estadístico de un determinado número de genes para una anotación concreta. Para ello se compara frente a anotaciones de referencia constituidas por genes cuya implicación se ha elaborado elaboradas en función de las

evidencias experimentales, publicaciones etc. En concreto se utilizó la última versión de la colección Biocarta.

Se encontraron sobrerregulados en el grupo control 75 de los 117 conjuntos génicos analizados, solamente el juego génico de la ruta de señalización tirosin kinasa c-src (CSK) mostró un enriquecimiento significativo en el grupo control con una contribución de falsa coincidencia $< 25\%$ (FDR q valor < 0.25). Además 5 cascadas de señalización: receptor del IGF1 (IGF1r), proteína de la region de ruptura (BCR), receptor manosa fosfato (MPR), promotor de muerte asociado a Bcl2 (BAD) y proteína tirosina kinasa (PYK2) obtuvieron un valor nominal de p valor (NOM p valor) $< 0,05$, aunque este valor no está ajustado por el tamaño de cada conjunto génico. Cabe destacar que las rutas más sobrerreguladas en controles formaban parte de cascadas de inmunomodulación (regulación de la activación de los linfocitos T y B), antiapoptosis o crecimiento y desarrollo.

En la tabla IV se muestran los 20 primeros conjuntos génicos sobrerregulados en sujetos control según el grado de enriquecimiento normalizado (NES) que ajusta los datos según el tamaño de los conjuntos génicos, la correlación entre los diferentes agrupamientos de genes analizados y los datos de expresión de los sujetos de estudio.

Tabla IV. Relación de conjuntos génicos sobrerregulados en los sujetos control según el grado NES.

NOMBRE	TAMAÑO	NES	NOM p valor	FDR q valor
Biocarta_csk_pathway	16	-2,000	0,002	0,125
Biocarta_igf1r_pathway	22	-1,690	0,031	0,628
Biocarta_bcr_pathway	29	-1,680	0,024	0,458
Biocarta_mpr_pathway	27	-1,650	0,038	0,416
Biocarta_bad_pathway	23	-1,640	0,023	0,351
Biocarta_nfat_pathway	41	-1,610	0,061	0,362
Biocarta_pyk2_pathway	27	-1,520	0,048	0,495
Biocarta_igf1mtor_pathway	19	-1,460	0,069	0,625
Biocarta_il2_pathway	18	-1,450	0,101	0,578
Biocarta_igf1_pathway	20	-1,420	0,105	0,623
Collagen	20	-1,410	0,120	0,583
Biocarta_gpcr_pathway	30	-1,400	0,107	0,565
Biocarta_fcer1_pathway	33	-1,390	0,128	0,535
Biocarta_mcalpain_pathway	22	-1,340	0,154	0,648
Biocarta_pdgf_pathway	30	-1,330	0,141	0,623
Biocarta_calcineurin_pathway	16	-1,320	0,167	0,624
Biocarta_eif4_pathway	22	-1,300	0,133	0,623

NOMBRE	TAMAÑO	NES	NOM p valor	FDR q valor
Biocarta_p38mapk_pathway	39	-1,300	0,178	0,600
Biocarta_at1r_pathway	31	-1,290	0,149	0,585
Biocarta_epo_pathway	18	-1,290	0,147	0,577

En el caso de pacientes artrósicos 42 de los 117 agrupamientos de genes analizados, no alcanzaron un nivel de significación FDR q valor $< 0,25$ o un valor NOM p valor $< 0,05$. En la tabla V se muestran los 20 primeros conjuntos génicos que se encontraron sobrerregulados en los pacientes artrósicos ordenados según el grado NES.

Las rutas de señalización mostradas, formaban parte de cascadas de inmunomodulación (macrófagos), apoptosis, inflamación o arresto del ciclo celular.

Tabla V. Relación de conjuntos génicos sobrerregulados en los pacientes artrósicos según el grado NES.

NOMBRE	TAMAÑO	NES	NOM p valor	FDR q valor
Biocarta_cdmac_pathway	15	1,520	0,076	1,000
Biocarta_ndkdynamin_pathway	18	1,400	0,113	1,000
Biocarta_caspase_pathway	21	1,370	0,150	1,000
Biocarta_nthi_pathway	22	1,340	0,107	1,000
Biocarta_ctcf_pathway	20	1,260	0,188	1,000
Biocarta_eif_pathway	16	1,200	0,253	1,000
Biocarta_hcmv_pathway	16	1,170	0,197	1,000
Biocarta_akt_pathway	20	1,170	0,217	1,000
Biocarta_rela_pathway	16	1,160	0,292	1,000
Biocarta_arf_pathway	16	1,100	0,337	1,000
Biocarta_nfkb_pathway	21	1,090	0,342	1,000
Biocarta_hivnef_pathway	54	1,090	0,337	1,000
Biocarta_gcr_pathway	15	1,080	0,352	1,000
Biocarta_death_pathway	31	1,060	0,401	1,000
Biocarta_tid_pathway	16	1,050	0,419	1,000
Biocarta_ceramide_pathway	22	1,040	0,409	1,000
Biocarta_carm_er_pathway	31	1,030	0,401	0,974
Biocarta_p53_pathway	16	1,020	0,411	0,975
Biocarta_ets_pathway	18	1,010	0,438	0,928
Biocarta_stress_pathway	24	0,990	0,488	0,951

Con base a estos resultados, nos centramos en el análisis de aquellos agrupamientos de genes que se habían relacionado previamente con artrosis (colágeno e *IGF1*) a pesar de que no eran los que alcanzaron el grado de significación más alto, o que habían

obtenido una gran representación en las rutas más sobrerreguladas en los sujetos de estudio como los genes relacionados con inmunomodulación, apoptosis o inflamación.

Con esta premisa, se realizaron otros 6 GSEAs específicos, uno por cada agrupamiento de genes de interés, usando todos los genes de colágeno, utilizando todos los genes relacionados con la cascada de señalización IGF1 (donde habíamos encontrado diferentes anotaciones en la tabla VI), con los genes relacionados con respuesta inmune, los genes relacionados con respuesta inflamatoria, los genes relacionados con apoptosis (en concreto relacionados con la ruta de las caspasas) y con los genes relacionados con crecimiento celular.

3.2.1 GSEA de genes de colágeno

Únicamente se utilizaron los genes de colágeno detectados al menos en una condición experimental. Los resultados mostraron que 11 de los 20 genes de colágeno analizados estaban más representados en el grupo control (Figura 15) y esta ruta alcanzaba un valor de significación FDR q valor < 0.25 al ser evaluada independientemente. Los resultados indicaban una disminución de la expresión transcripcional de los genes de colágeno en CMMs de artrosis; esta disminución también afectaba al *COL10A1*, el único marcador molecular conocido de condrocitos hipertróficos^[125].

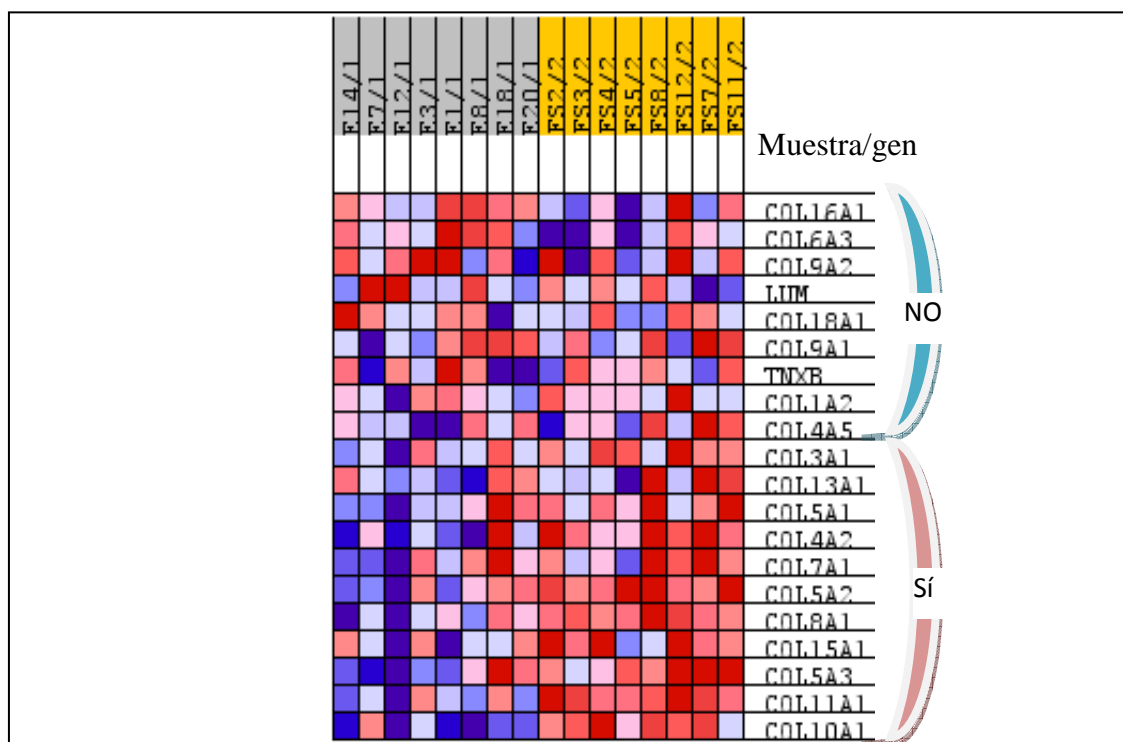


Figura 15. Agrupamiento de genes relacionados con colágeno. Mapa de puntos calientes que muestra la agrupación de genes que llevan la carga diferencial de este juego génico. Los valores de expresión están representados con colores, donde el rango de colores (rojo, rosa, celeste y azul oscuro) muestra el rango de valores de expresión (alto, moderado, bajo y muy bajo). Los genes con valor “Sí” son aquellos que contribuyen con más carga en cada subgrupo, los subgrupos de genes que contribuyen mayoritariamente para enriquecer el resultado.

3.2.2 GSEA de genes de IGF1

Al realizar el análisis del agrupamiento de genes relacionados con IGF1, incluyendo a todos los genes relacionados con esta ruta de señalización, se alcanzó un nivel de significación FDR q valor $< 0,25$. Los datos muestran que 57 de los 73 genes relacionados con la cascada de señalización IGF1 estaban regulados al alza en CMMs control, indicando por lo tanto, que esta ruta de señalización estaba infraregulada en las CMMs de artrosis (Figura 16).

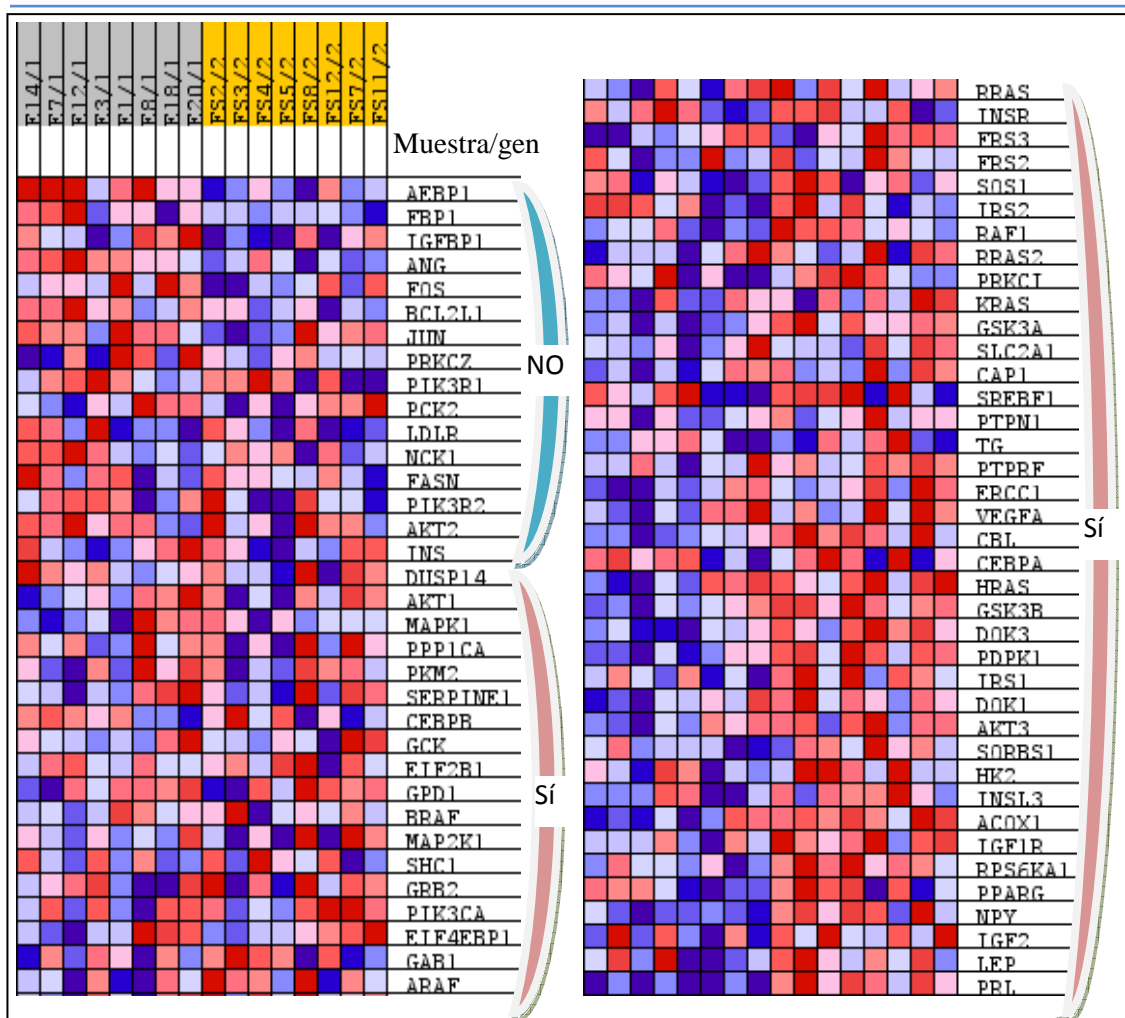


Figura 16. Agrupamiento de genes relacionado con la ruta de señalización de IGF1. Mapa de puntos calientes que muestra la agrupación de genes que llevan la carga diferencial de este juego génico. Los valores de expresión están representados con colores, donde el rango de colores (rojo, rosa, celeste y azul oscuro) muestra el rango de valores de expresión (alto, moderado, bajo y muy bajo). Los genes con valor “Sí” son aquellos que contribuyen con más carga en cada subgrupo, los subgrupos de genes que contribuyen mayoritariamente para enriquecer el resultado.

3.2.3 GSEA de genes de apoptosis (ruta de las caspasas)

Se realizó un análisis mediante el GSEA de 21 genes de la ruta de apoptosis a través de las caspasas c para determinar las diferencias de expresión de estos genes entre los sujetos de estudio (Figura 17). Se encontraron 12 genes sobrerregulados en los pacientes artrósicos y el nivel de significación de este conjunto génico alcanzó FDR q valor <0.25.

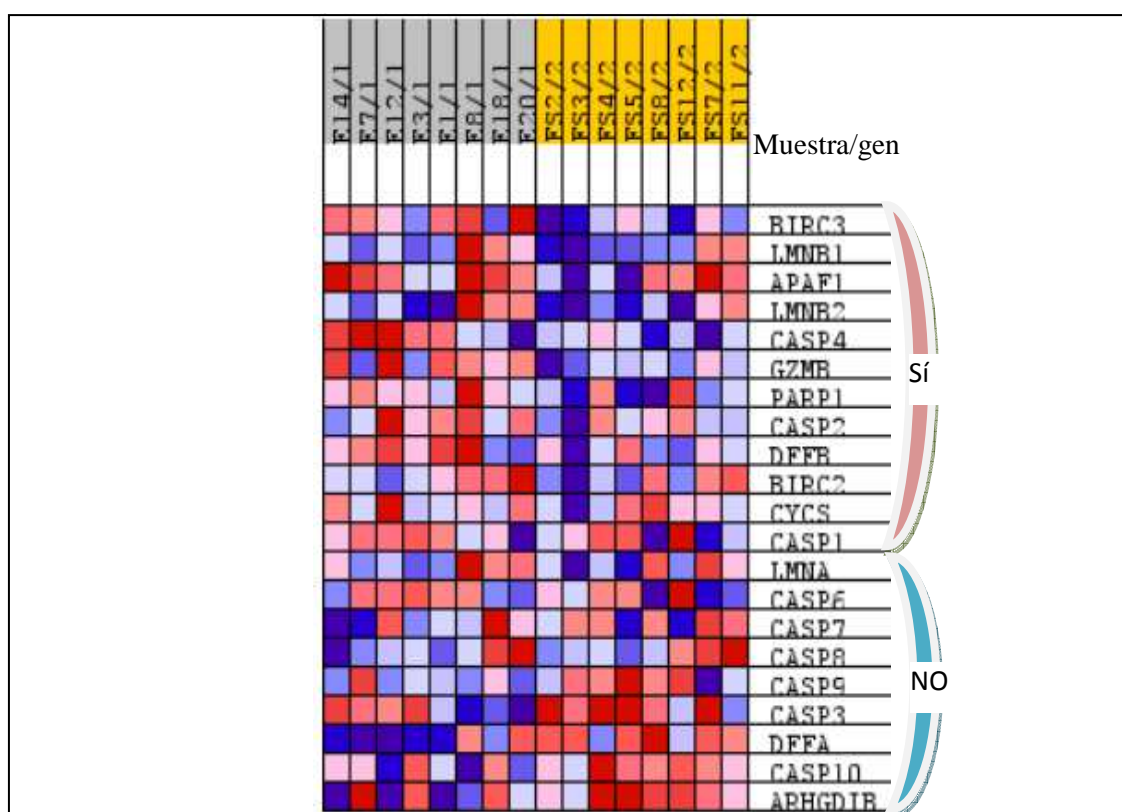


Figura 17. Agrupamiento de genes relacionados con apoptosis a través de la ruta de las caspasas. Mapa de puntos calientes que muestra la agrupación de genes que llevan la carga diferencial de este juego génico. Los valores de expresión están representados con colores, donde el rango de colores (rojo, rosa, celeste y azul oscuro) muestra el rango de valores de expresión (alto, moderado, bajo y muy bajo). Los genes con valor “Sí” son aquellos que contribuyen con más carga en cada subgrupo, los subgrupos de genes que contribuyen mayoritariamente para enriquecer el resultado.

3.2.4 GSEA de genes de respuesta inflamatoria

Se estudiaron mediante GSEA 81 genes relacionados con respuesta inflamatoria para evaluar las diferencias de expresión de estos genes entre los sujetos de estudio (Figura 18). Solamente se encontraron 18 genes sobrerregulados en los sujetos control y el nivel de significación de este conjunto génico no alcanzó FDR q valor <0.25 .

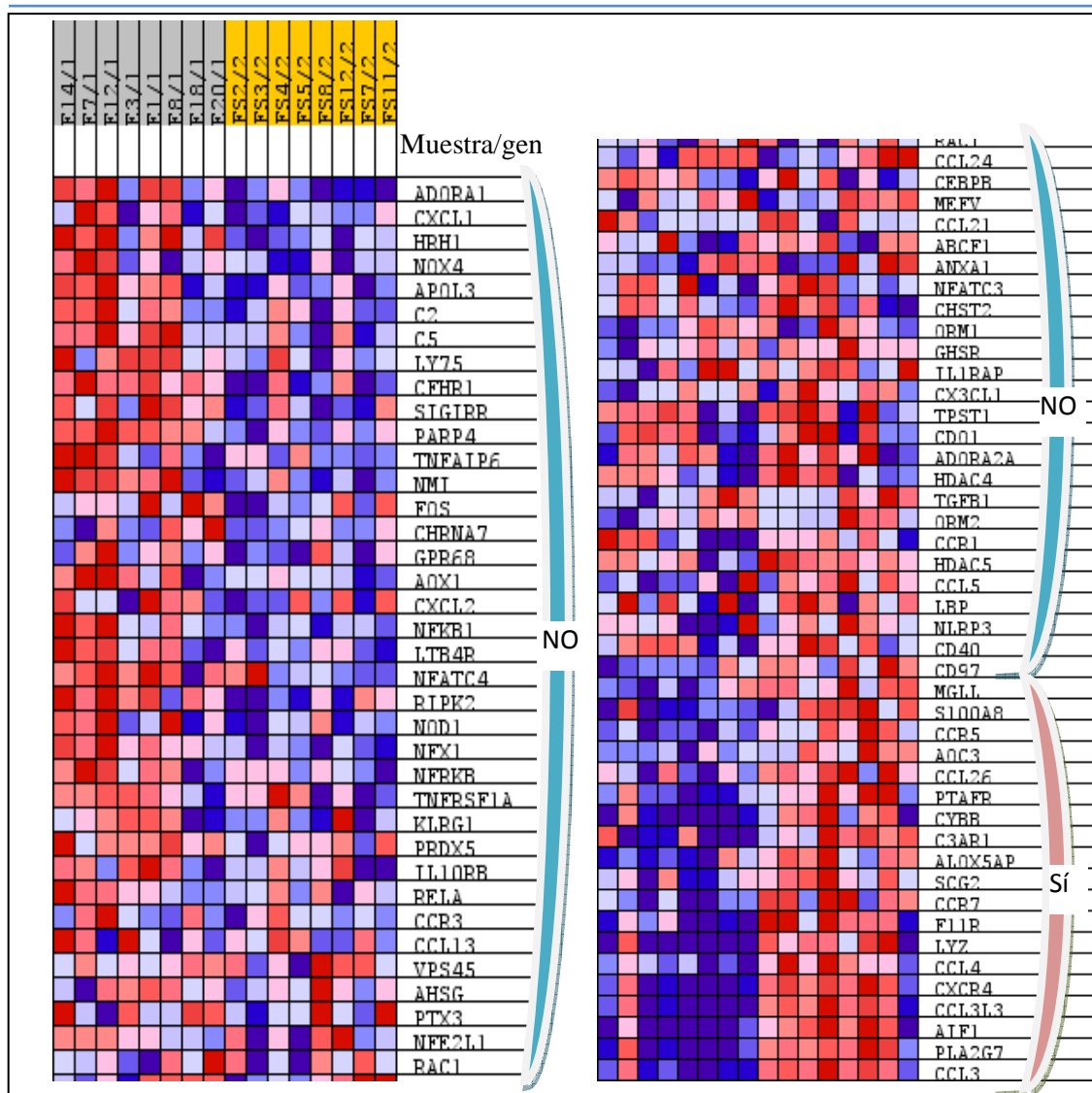


Figura 18. Agrupamiento de genes relacionados con la respuesta inflamatoria. Mapa de puntos calientes que muestra la agrupación de genes que llevan la carga diferencial de este juego génico. Los valores de expresión están representados con colores, donde el rango de colores (rojo, rosa, celeste y azul oscuro) muestra el rango de valores de expresión (alto, moderado, bajo y muy bajo). Los genes con valor “Sí” son aquellos que contribuyen con más carga en cada subjuego, los subjuegos de genes que contribuyen mayoritariamente para enriquecer el resultado.

3.2.5 GSEA de genes de respuesta inmune

Para comparar la expresión de genes relacionados con sistema inmune en los sujetos de estudio, se realizó un GSEA con 149 genes, de los que solamente 30 genes mostraron sobrerregulación en los pacientes control. El nivel de significación FDR q valor fue > 0.25 (Figura 19).

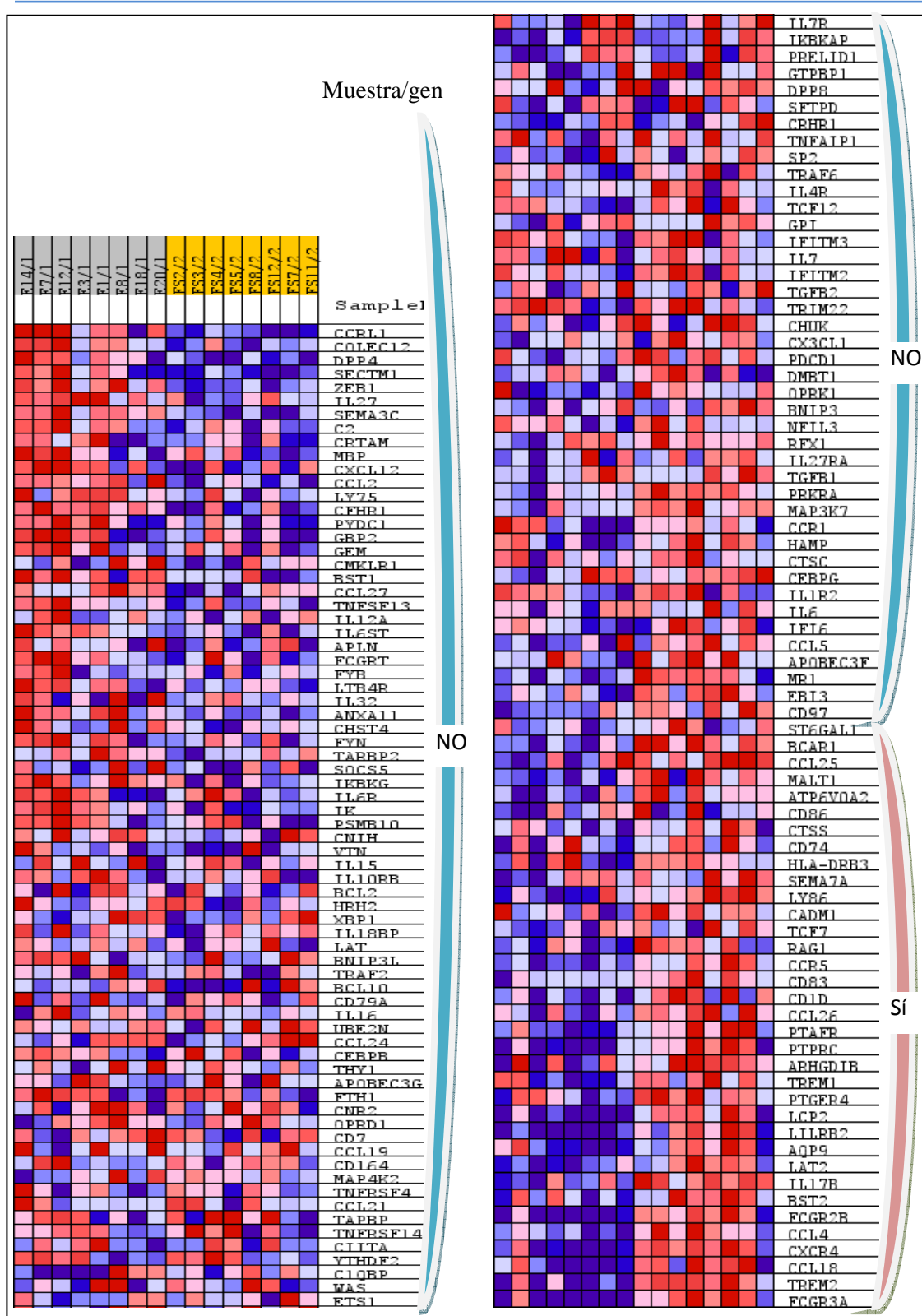


Figura 19. Agrupamiento de genes relacionados con la respuesta inmune. Mapa de puntos calientes que muestra la agrupación de genes que llevan la carga diferencial de este juego génico. Los valores de expresión están representados con colores, donde el rango de colores (rojo, rosa, celeste y azul oscuro) muestra el rango de valores de expresión (alto, moderado, bajo y muy bajo). Los genes con valor "Sí" son aquellos que contribuyen con más carga en cada subjuego, los subjuegos de genes que contribuyen mayoritariamente para enriquecer el resultado.

3.2.6 GSEA de genes implicados en la regulación del crecimiento celular

Analizamos las diferencias génicas en cuanto a la regulación del crecimiento celular en entre los sujetos de estudio (Figura 20). La mitad de los genes analizados estuvieron sobrerregulados en pacientes artrósicos, aunque la significación de este conjunto génico no alcanzó FDR q valor <0.25 .

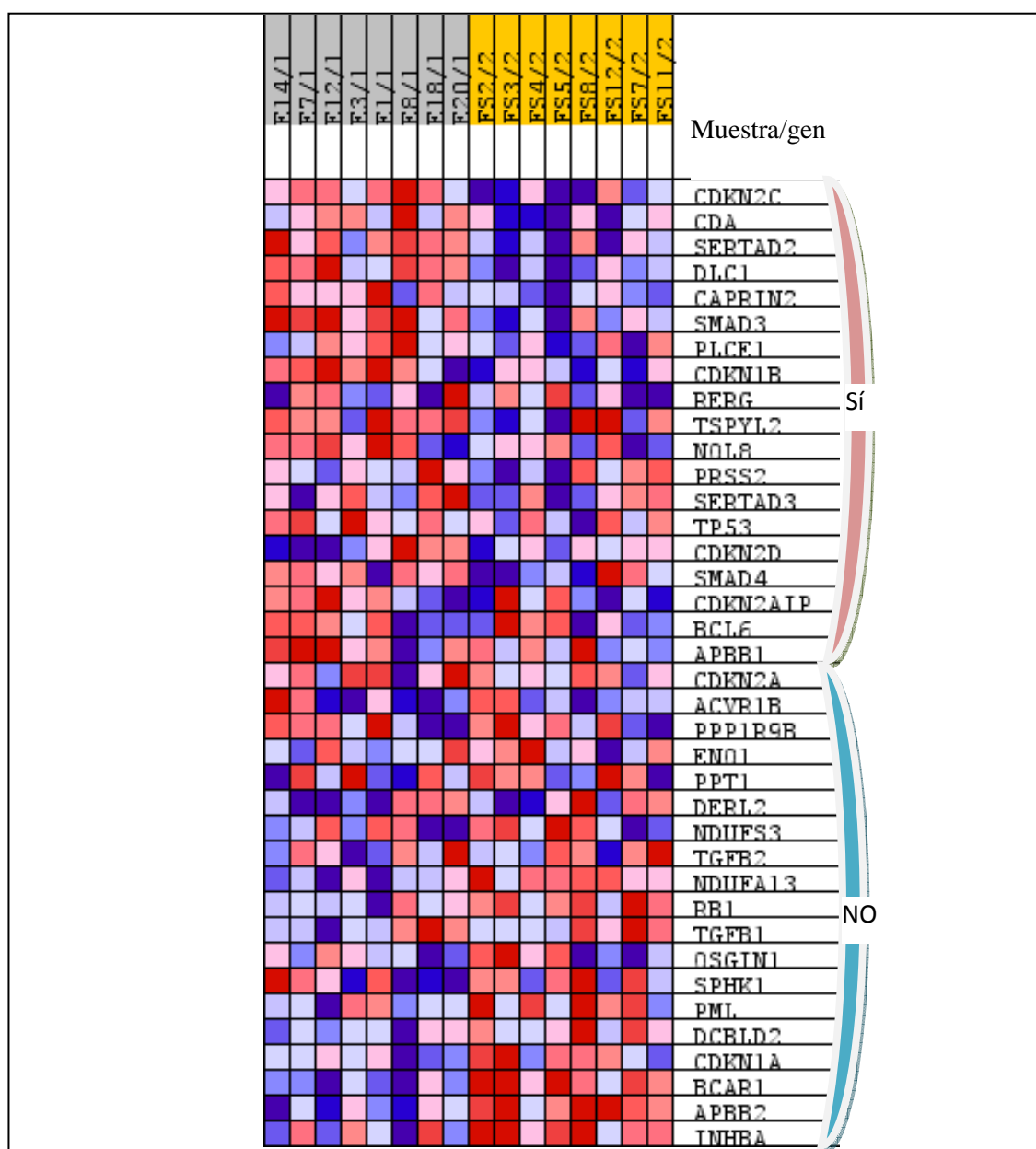


Figura 20. Agrupamiento de genes relacionados con la regulación del crecimiento celular. Mapa de puntos calientes que muestra la agrupación de genes que llevan la carga diferencial de este juego génico. Los valores de expresión están representados con colores, donde el rango de colores (rojo, rosa, celeste y azul oscuro) muestra el rango de valores de expresión (alto, moderado, bajo y muy bajo). Los genes con

valor “Sí” son aquellos que contribuyen con más carga en cada subjuego, los subjuegos de genes que contribuyen mayoritariamente para enriquecer el resultado.

3.3 Asociaciones genéticas encontradas con artrosis

3.3.1 Asociaciones genéticas del polimorfismo del COL10A1 con artrosis

Para comprender mejor el papel del COL10A1 en la patogénesis de la artrosis, se estudiaron tres de los SNPs de su gen (rs494551, rs1931897 y rs11965969) en una cohorte que incluía 191 pacientes con artrosis y 283 controles correspondientes. Los SNPs rs494551 y rs1931897 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en su distribución genética entre pacientes con artrosis y controles. Sin embargo, rs11965969 (tabla VI) mostró diferencias significativas cuando se comparaban TT con TG+GG entre pacientes con artrosis y el total de controles (OR 1,68; 95% CI 1,09 a 2,59; $p=0,0013$, tabla 1). Debido a que la probabilidad del diagnóstico de artrosis aumenta con edad, se realizó el mismo análisis estadístico usando como grupo control solamente a los individuos cuya edad era >45 años y >55 años, en este caso las diferencias significativas se mantuvieron, pero las ORs se incrementaron (TT vs TG+GG entre pacientes con artrosis y controles de más de 45 años (OR 1,70, 95% CI 0,98 a 2,95; $p=0,043$) y entre pacientes con artrosis y controles de más de 55 años (OR=2,15, 95% CI 1,09 a 4,27; $p=0,0017$)). Estos resultados proporcionan la evidencia de una asociación genética entre el polimorfismo rs11965969 del gen *COL10A1* y la artrosis.

Tabla VI. Frecuencia genotípicas y alélicas del SNP rs11965969 en el gen de COL10A1 de pacientes con artrosis y sujetos sanos. Los valores se expresan en número de sujetos (%).

rs 11965969 n (%)						
Frecuencias genotípicas				Frecuencias alélicas		
		TT	TG	GG	alelo T	alelo G
Control	Total (n = 283)	63 (22)	155 (55)	65 (23) *	281 (50)	285 (50)
	> 45 años (n = 127)	28 (22)	71 (56)	28 (22) †	127 (50)	127 (50)
	> 55 años (n = 82)	15 (18)	45 (55)	22 (27) ‡	75 (46)	89 (54)
Artrosis (n = 191)		62 (32)	74 (39)	55 (29)	198 (52)	184 (48)
* TT vs (TG+GG); IR 1,68 (95% CI 1,09 - 2,59); p = 0,013 † TT vs (TG+GG): OR 1,70 (95% CI 0,98 - 2,95); p = 0,043 ‡ TT vs (TG + GG): OR 2,15 (95% CI 1,09 - 4,27); p = 0,00017						

3.3.2 Asociaciones genéticas del polimorfismo del IGF1 con artrosis

La comparación de frecuencias alélicas del SNP rs35767 de *IGF1* entre pacientes artrósicos y sujetos control se muestra en la tabla VII. Al comparar las frecuencias alélicas entre los sujetos control mayores de 71 años y el grupo de artrosis estratificado según la articulación afectada, observamos diferencias significativas únicamente en el grupo de artrosis de cadera ($p < 0,0001$).

Sin embargo, esta observación podría estar influenciada por el género de los pacientes ya que el porcentaje entre mujeres y hombres era diferente según la articulación afectada. En el caso de la artrosis de rodilla, el 76% de los pacientes eran mujeres, mientras que en el caso de la artrosis de cadera, este porcentaje se reducía hasta el 56%. Por lo tanto, se ajustó el efecto del alelo G en la progresión de la artrosis de cadera por género y edad. Después de la corrección, aún existían diferencias estadísticamente significativas en el grupo de artrosis de cadera con un p valor = 0,0052, una OR = 3,1 y unos intervalos de confianza (CI) del 95% de 1,4 a 6,8. Estos resultados sugieren que el riesgo de desarrollar artrosis o su progresión es el resultado de los efectos aditivos del SNP rs35767 en el gen IGF1 y del género de los pacientes. La graduación radiológica KL o la incidencia de cirugía de reemplazamiento articular no mostró ninguna relación con el SNP 35767 de IGF1.

Tabla VII. Frecuencias alélicas del SNP rs 35767 en el gen de IGF1 de pacientes artrósicos y sujetos control. Los valores se expresan en número de sujetos (%). La Odds ratio (OR), los intervalos de confianza del 95% (95% CI) y los p valor se basan en la comparación de las frecuencias alélicas entre pacientes artrósicos y sujetos control. ns. = no significativo.

IGF1 (Alelicas)		G		A		P	OR (95% C.I.)
		2n	%	2n	%		
Artrosis	Rodilla	610	78	172	22	ns	
	Cadera	297	95	17	5	0,000017	4,18 (2,03-8,65)
	Ambas	71	79	19	21	ns	
Controles > 71 años		92	81	22	19		

3.4 Validación de los resultados obtenidos mediante GSEA

Se realizó una validación de los datos más relevantes y significativos que se obtuvieron mediante el análisis GSEA.

3.4.1 Validación de los resultados del juego génico de colágeno: COL10A1

Centramos la validación en el *COL10A1* puesto que era el gen de colágeno donde se encontró mayor disminución de expresión dentro de su juego génico. Se confirmó la disminución de la expresión previamente observada en el análisis del microarray con la medida de los niveles de ARNm del COL10A1 usando RT-PCR. Se analizaron 13 pacientes con artrosis (7 diferentes a los usados en el análisis original) que tuvieron un NR <1 comparado con 7 controles (4 fueron muestras adicionales), lo que indicaba una expresión reducida (Figura 21). No obstante, la disminución del grado de expresión diferenciada observada, es probablemente el resultado de la diferencia en la sensibilidad de los dos ensayos. Sin embargo, los resultados validaron el uso y la reproducibilidad del protocolo utilizado en el microarray del genoma completo.

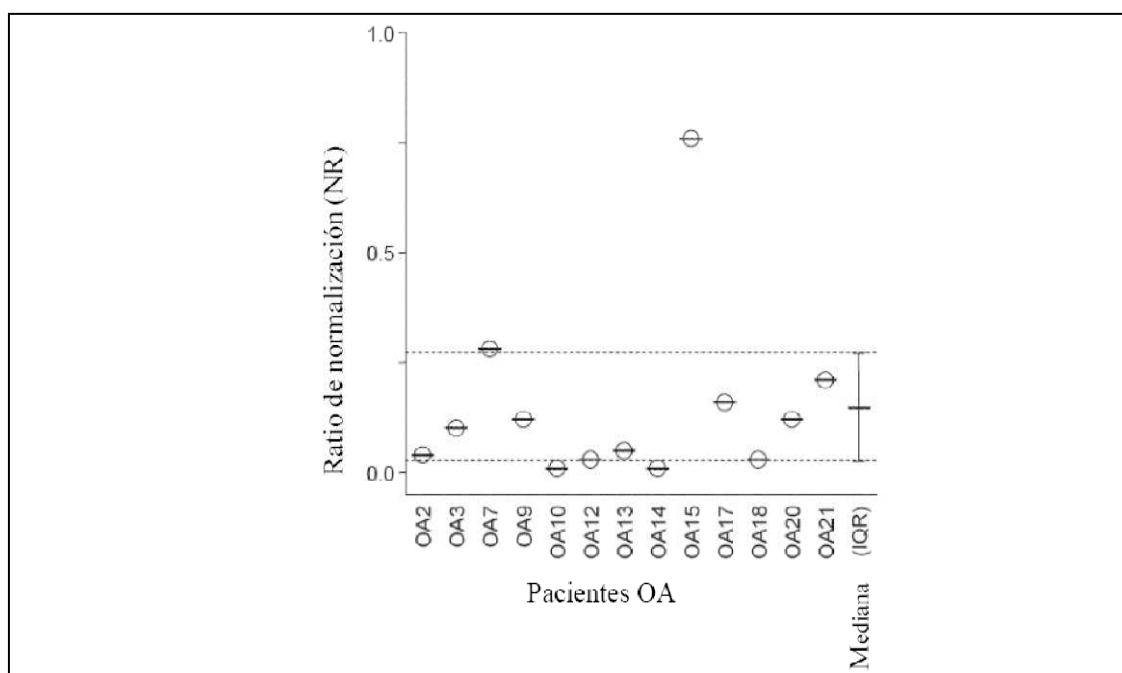


Figura 21. Validación por PCR cuantitativa de la expresión de genes de colágeno. ARNm del COL10A1 en pacientes con artrosis. Los resultados se expresan como ratio de normalización (NR). Se asignó a los controles sanos un $NR = 1$ y todos los pacientes de artrosis tuvieron $NRs < 1$. Los niveles de expresión de ARNm del COL10A1 fueron más bajos en todos los pacientes analizados de artrosis (mediana 0,10 (IQR 0,03-0,16)). Los pacientes con artrosis expresan por tanto 10 veces menos ARNm del COL10A1 que los individuos control.

3.4.2 Validación de los resultados del juego génico de IGF1

Ya que IGF1 es una proteína abundante en suero, realizamos un ELISA en sueros de los sujetos de estudio para validar los datos obtenidos mediante microarray analizados por GSEA. Los niveles obtenidos de IGF1 en suero fueron significativamente diferentes, si se consideraba como variable el grado radiológico KL e independientemente del género de los sujetos (Figura 22 A). Se seleccionó el valor de IGF1 en suero (ng/mL) del grupo KL = 0-I de la escala radiológica KL como grupo control de referencia debido a que se corresponde con cambios radiológicos inexistentes o mínimos. Se detectó una disminución de los niveles de IGF1 directamente proporcional al aumento de puntuación en la escala radiológica KL. Además, cuando analizamos el grupo KL = IV, el máximo grado de cambios radiológicos relacionados con artrosis en esta escala, se encontraron los niveles más bajos de IGF1 entre todos los pacientes analizados ($p < 0,0001$).

Es interesante destacar, que independientemente del grado radiológico KL que presentaban los pacientes, los niveles más bajos de IGF1, se correspondieron con los pacientes que poseían el alelo G del SNP rs35767 en el gen *IGF1* (Figura 22 B).

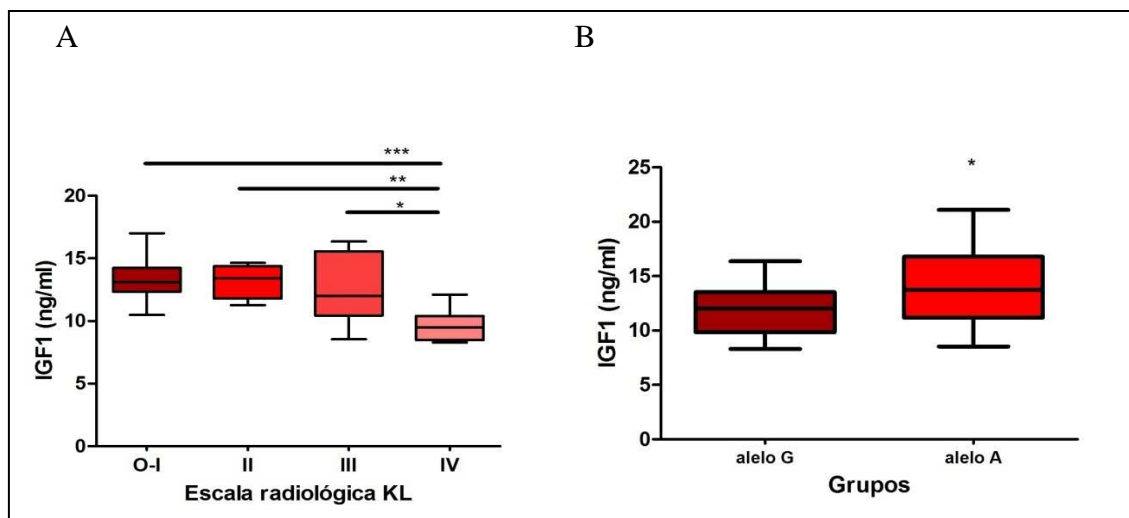


Figura 22. Niveles de IGF1 en suero de pacientes y sujetos control medidos mediante ELISA (ng/mL). Se midieron espectrofotométricamente, duplicados de 16 pacientes artrósicos y 16 sujetos control. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ comparado a el grupo control y KL = 0-I.

4. Aproximación terapéutica: uso de CMMs en terapias celulares de inmunomodulación

Una de las características más conocida de las CMMs es su capacidad inmunosupresora. En nuestro estudio los genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria no diferían entre los grupos analizados. Con la finalidad de determinar si estas propiedades inmunomoduladoras de las CMMs se mantenían a nivel funcional, se evaluó la expresión y secreción de factores inmunomoduladores y de crecimiento de las CMMs de origen artrósico.

4.1. Propiedades inmunomoduladoras de las CMMs artrósicas: Expresión génica

Las propiedades inmunomoduladoras de las CMMs artrósicas fueron evaluadas cultivándolas en monocapa y en tres dimensiones, embebidas en alginato. Para simular el entorno inflamatorio los cultivos se realizaron en condiciones proinflamatorias en

presencia de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$, o en ausencia de estímulo a diferentes tiempos de cultivo. Ambas condiciones de cultivo, mostraron un patrón de expresión génica similar (Figura 23), en el que se observó una mayor expresión de *IL6* y de *IDO* ($p<0.05$) en respuesta a $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$. La expresión de *TIMP1* no se vio afectada por la presencia de estas citoquinas en el medio de cultivo, en ninguna de las condiciones estudiadas. Adicionalmente se observó una menor expresión de *TGF β 1* en ambas condiciones de cultivo, que sólo se alcanzaron valores significativos en los cultivos de alginato ($p<0,05$). En contraste la expresión génica de *TIMP2* y *VEGF* sólo se encontró infra regulada en las CMMs cultivadas en monocapa ($p<0.05$).

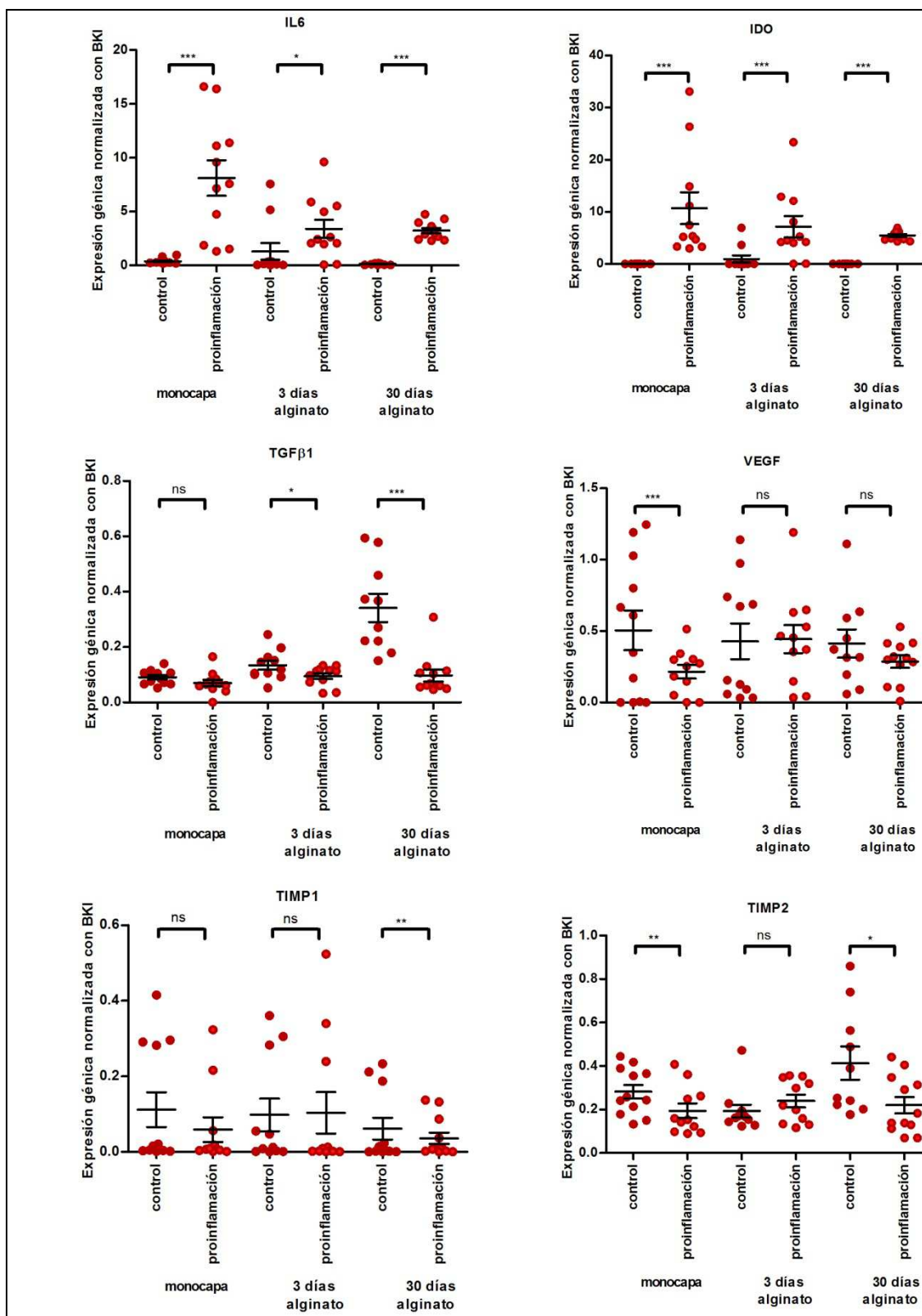


Figura 23. Expresión génica de genes inmunomoduladores de las CMMs, con y sin estimulación de las citoquinas proinflamatorias (TNF α /IFN γ), cultivadas en monocapa o embebidas en alginato después de 3 o 30 días en la matriz. Los datos se expresan en medias \pm media del error estándar (SEM) de 4 pacientes artrósicos con duplicados o triplicados de cada paciente. Todos los datos individuales se han

representado, excepto dos valores muy distantes del resto del grupo (uno en el caso del gen de *TGFβ1* y uno en el caso del gen de *TIMP2*), aunque fueron incluidos en los análisis estadísticos. *BKI*: índice de genes control, que en este caso es la media de los genes de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (*GAPDH*), ubiquitina C (*UBC*) e hipoxantina fosforibosiltransferasa (*HPRT*); *IL6*: interleucina 6; *IDO*: indolemaine 2,3-dioxigenasa; *TGFβ1*: factor de crecimiento transformante β1; *VEGF*: factor de crecimiento vascular endotelial; *TIMP1*: inhibidor de metaloproteinasas típico de tejido 1; *TIMP2*: inhibidor de metaloproteinasas típico de tejido 2. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para evaluar si las CMMs embebidas en alginato mantenían su capacidad de respuesta inmunosupresora después de un largo periodo de cultivo, se realizó la misma estimulación con $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ de las CMMs a las 24 horas de su inclusión en alginato y tras 30 días de cultivo en alginato. Las CMMs embebidas en alginato durante 30 días respondieron al estímulo proinflamatorio de la misma manera que habían respondido cuando las CMMs se cultivaban en monocapa o sólo se habían mantenido durante 24 horas en esta matriz. Las CMMs tras estar 30 días incluidas en alginato, respondieron a la presencia de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$, sobrerregulando *IL6* y *IDO* ($p < 0.05$) e infraregulando *TGFβ1*, *TIMP1* y *TIMP2* ($p < 0.05$). *VEGF* no sufrió alteraciones en su expresión génica (Figura 23). La expresión de *TGFβ1* parecía ser más alta cuando las CMMs embebidas en alginato durante 30 días no eran expuestas al estímulo proinflamatorio, aunque no se obtuvieron diferencias significativas.

4.2. Propiedades inmunomoduladoras de las CMMs de pacientes artrósicos: Análisis de los factores secretados

Se analizó la secreción de factores inmunomoduladores como *IL6*, *TIMP2* y la actividad de *IDO* tras el cultivo de las CMMs en alginato usando el cultivo en monocapa como grupo control. Las CMMs secretaron estos 3 factores después de 30 días en cultivo en alginato (tabla VIII). La actividad de *IDO* y la secreción de *IL6* se incrementó cuando las células se cultivaron con $\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma$, en concordancia con los análisis de expresión génica, aunque en el caso de *IL6* no se alcanzaron diferencias significativas debido probablemente a la gran variabilidad entre los pacientes analizados. La secreción de *TIMP2* no se alteró en ninguna de las condiciones tras exponer las células a condiciones proinflamatorias.

Tabla VIII. Factores secretados por las CMMs cultivadas en monocapa o embebidas en alginato durante 3 ó 30 días. Secreción de IL6 (pg/mL) y TIMP2 (pg/mL) medida en el medio de cultivo mediante ELISA junto con la actividad enzimática de IDO medida espectrofotométricamente mediante los niveles de kinerunina (ng/mL). Los datos se expresan en medias \pm SEM de 3 pacientes artrósicos con replicados por cada paciente. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ comparando medio con o sin estímulo de citoquinas proinflamatorias TNF α /IFN γ . u.d = inferior al límite de detección.

	Monocapa		Alginato			
	3 días		3 días		30 días	
	Control	Proinflamación	Control	Proinflamación	Control	Proinflamación
IL6 pg/mL	5495 \pm 553	53594 \pm 3335 *	1650 \pm 1271	36044 \pm 23304	u.d.	4148 \pm 2439
TIMP2 pg/mL	26181 \pm 5099	27750 \pm 3917	15541 \pm 8027	15291 \pm 7669	9483 \pm 6913	8635 \pm 5518
Kinurenina (IDO activity) ng/mL	440 \pm 158	13069 \pm 1012 **	690 \pm 631	11531 \pm 102 *	1430 \pm 1430	7661 \pm 1548 *

Debido a que los niveles de factores secretados fueron inferiores tras 30 días de cultivo en alginato, se evaluó si esto era debido a un efecto sobre la supervivencia de las CMMs provocado por su inclusión en alginato. Esta evaluación se llevó a cabo mediante la medida del contenido de ADN en el cultivo de alginato, realizada a diferentes tiempos después de la inclusión. Los resultados obtenidos mostraron que el contenido de ADN disminuía tras la inclusión de las CMMs en alginato ($p < 0.001$), hasta llegar aproximadamente al 40% del contenido de ADN inicial a los 30 días de cultivo (Figura 24). Aparentemente las células restantes fueron capaces de secretar factores inmunomoduladores después del estímulo proinflamatorio de TNF α /IFN γ .

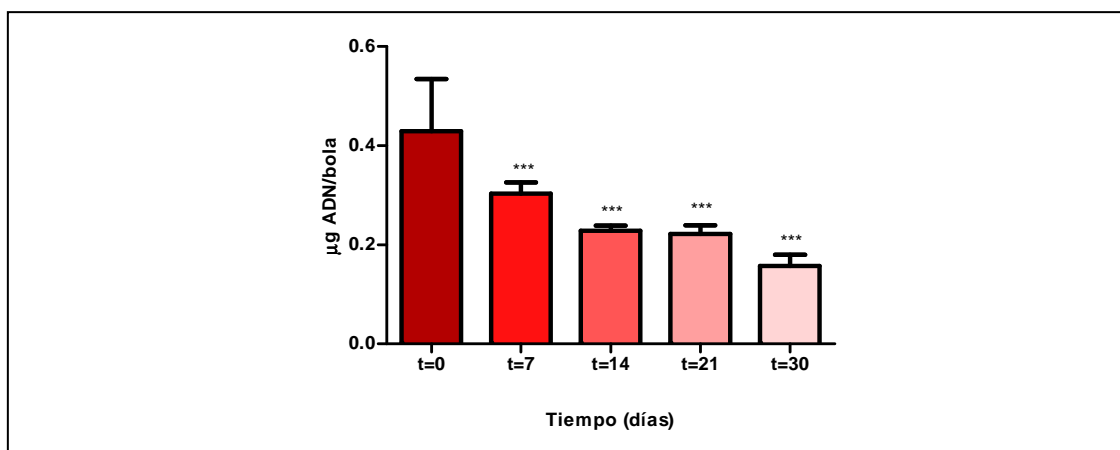


Figura 24. Contenido de ADN de las CMMs artróticas embebidas en alginato durante 30 días de cultivo. Los datos están expresados en medias \pm SEM de los duplicados o triplicados de 3 pacientes en cada tiempo. *** $p < 0.001$ en comparación con $t=0$.

4.3. Capacidad de diferenciación de las CMMs artróticas embebidas en alginato

Para determinar el efecto que ejercía una inclusión en alginato sobre las propiedades de diferenciación de las CMMs, se procedió a la exclusión de las CMMs de la matriz transcurridos 3 ó 30 días de cultivo en ella y se realizaron ensayos de diferenciación adipogénica y osteogénica utilizando como grupo control las CMMs cultivadas en monocapa (datos no mostrados). El resultado fue que las CMMs liberadas del alginato, eran capaces de diferenciarse adipogénica y osteogénicamente, aunque en menor medida que las CMMs cultivadas en monocapa durante el mismo periodo.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio era determinar la adecuación o no del uso de CMMs de origen artrósico en terapias celulares autólogas o alogénicas en el caso de artrosis. Las CMMs se han utilizado como agentes terapéuticos en varios modelos de lesiones tisulares en experimentación animal^[65-69]. Su caracterización es imprescindible para asegurar el éxito de los tratamientos basados en su uso. En este estudio, hemos testado positivamente la capacidad de proliferación de las CMMs, expandiendo las CMMs hasta un pase 6 de cultivo y que la capacidad de diferenciación hacia los distintos linajes mesodérmicos como condrocitos, adipocitos y osteoblastos se conservaba. Además, verificado que estas células presentaban los marcadores característicos de las CMMs tales como CD90, CD73, CD105 y CD166. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre pacientes artrósicos y sujetos sanos en este aspecto, la ausencia de capacidad de regeneración tisular en las articulaciones de los pacientes artrósicos que podría estar en el propio origen de la patología o en su agravamiento, hace pensar que al menos parcialmente la enfermedad depende de la incapacidad intrínseca de las CMMs para reparar

El abordaje de esta hipótesis se realizó analizando las diferencias transcripcionales, a nivel del genoma completo, entre las CMMs de pacientes con artrosis y sujetos control. Se encontró que en efecto existían diferencias entre ambos grupos, de modo que 1.967 genes estaban expresados diferencialmente. La mayor proporción de estos genes estaban regulados a la baja en las CMMs procedentes de los donantes con artrosis. Una vez agrupados en categorías funcionales se observó que en general pertenecían a genes implicados en las funciones de transducción de señales, el desarrollo y la diferenciación celular; todas ellas esenciales para la correcta función de las células pluripotenciales. Este resultado es indicativo de la existencia de una mayor limitación funcional de las CMMs de origen artrósico, que probablemente incide en una peor generación de aquellos linajes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del tejido musculoesquelético.

Profundizando en el análisis, hemos demostrado que las CMMs de artrosis presentaban una menor expresión de genes relacionados con su capacidad regenerativa, entre ellos el *COL10A1* e *IGF1*. Además, se encontraron asociaciones genéticas entre

algunos SNPs de estos genes y la artrosis, al menos en las poblaciones españolas estudiadas. El rs11965969 en el caso de *COL10A1* y rs35767 en el caso de *IGF1* en la población española.

Si bien una de las funciones más exploradas en la actualidad, por su futura utilidad, es la capacidad inmunomoduladora de las CMMs, en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas, entre ambos grupos de estudio analizados, que revelasen una diferente expresión de genes relacionados con esta propiedad de las CMMs. Con la finalidad de asegurarnos de que esto era en realidad así, se realizó un estudio complementario para estudiar funcionalmente las propiedades inmunomoduladoras de las CMMs de pacientes artrósicos, observándose que éstas conservaban la capacidad de respuesta a factores proinflamatorios, incluso después de varias semanas de cultivo *in vitro*, embebidas en una matriz de alginato. Estos resultados son indicadores de que las expectativas de utilización de las CMMs en enfermedades con un componente inflamatorio, en nuestro caso la artrosis, es factible de ser tratado con CMMs autólogas en lo referente a su potencial inmunomodulador.

Analizando los resultados pormenorizadamente el esquema que se siguió fue el siguiente:

Además de una menor expresión de genes implicados en la homeostasis de los tejidos articulares, las CMMs de artrosis también mostraron una menor expresión de genes codificantes de proteínas estructurales y reguladoras. Entre estas, la *SPP1*, una glicoproteína secretada que une componentes estructurales de la ECM involucrada en la regulación de la mineralización del hueso. *SPP1*, que se expresa tempranamente en la diferenciación de células mesenquimales, está implicada en la migración celular así como en la osteogénesis^[126]. También estaba menos expresado el gen *SFRP2*, que codifica para una de las proteínas de SFRPs y que regula negativamente la ruta de la **WNT**^[127]. Esta ruta incluye factores de señalización que regulan procesos del desarrollo críticos para la organización del plato de crecimiento, la definición del límite del cartílago y la osificación endocondral^[128]. Además, se ha descrito que ciertas proteínas de la WNT inhiben la condrogénesis^[129], adipogénesis^[130] y tienen un efecto dual en la osteogénesis^[131]. La señalización WNT/ β -catenina regula estrictamente la maduración y función del fenotipo condrocítico, debido a la unión de Frizzled y SFRPs con el receptor de la LDL^[131]. y el hecho de la disminución de expresión de *SFRP2*

probablemente impide a las CMMs de artrosis completar su proceso de diferenciación terminal para proporcionar otros linajes musculoesqueléticos. Esta ruta por lo tanto tiene un papel fundamental en la función del cartílago articular, el hueso subcondral, y por extensión en la correcta formación de las estructuras articulares que en caso de ser defectiva puede estar en el origen de la patogénesis de la artrosis^[132]

RUNX3, era otro de los genes que mostraba una menor expresión. La proteína que codifica este gen forma un complejo ternario con la β -catenina y atenúa así, la señal de activación de la WNT. Los 3 miembros de la familia RUNX poseen funciones específicas durante la condrogénesis^[133] y forman parte de las cascadas de señalización mediadas por TGF β y proteínas morfogenéticas de hueso^[134]. Principalmente, *RUNX1* está involucrado en la hematopoyesis, *RUNX2* tiene varios papeles en la osteogénesis y *RUNX3* media la maduración condrocítica^[135]. En concreto, *RUNX3* regula negativamente a *Osterix*, un factor de transcripción necesario para la osteogénesis. La sobreexpresión de *RUNX3* también conlleva el aumento de la expresión de integrinas que podrían contribuir potencialmente a un realzamiento de la migración celular^[136]. Por tanto, la disminución de la expresión de *RUNX3* observada en nuestro estudio, probablemente contribuye en el desequilibrio existente entre la diferenciación condrogénica y osteogénica.

Otros genes relacionados también con la ruta de la WNT los genes *BARX1*, *RSPO2*, *RSPO3* y *DACT1* mostraban igualmente una menor expresión en CMMs de artrosis. *BARX1* es un atenuador la señalización del receptor de la ruta de WNT, y esencial para la proliferación celular, la agregación y la condensación de condrocítica^[137]. *RSPO2* y *RSPO3* son miembros de la familia de proteínas secretadas RSPO, y han sido relacionados con el desarrollo en vertebrados, donde actúan como ligandos de Frizzled^[48] y LRP6 (receptor relacionado con receptor de la LDL), promocionando así la activación de la señalización de WNT^[138, 139]. *DACT1* pertenece a la familia de proteínas Frodo/dapper la cual contiene adaptadores de señalización que interactúan y regulan la WNT y otras rutas de señalización durante el desarrollo y el cáncer^[140].

Con el objetivo de profundizar en las diferencias transcripcionales encontradas entre las CMMs de artrosis y sujetos sanos analizamos los datos obtenidos mediante un análisis GSEA. Tras el estudio, la información que obtuvimos consistió en una relación de los agrupamientos de genes que se encontraban más representados en cada condición

de estudio, el valor estadístico de este enriquecimiento y la información de los genes de cada juego génico que contribuían en mayor medida a estas diferencias.

En relación con los resultados anteriores en las CMMs control se encontraron enriquecidos juegos génicos relacionados con crecimiento y desarrollo. Una diferencia destacable cuando analizamos los juegos génicos enriquecidos en cada tipo de sujeto es que entre los subjuegos génicos enriquecidos en las CMMs control se encontraban genes relacionados con rutas antiapoptóticas mientras que en CMMs de artrosis, varios subjuegos enriquecidos pertenecían a rutas de apoptosis.

Para comprobar este dato, se realizó un GSEA exclusivo de genes relacionados con cascadas de apoptosis a través de la ruta de las caspasas (que a priori, parecía ser la más alterada), y se encontró un enriquecimiento de esta ruta en CMMs artrósicas. Para determinar si la proliferación celular también estaba alterada a nivel génico, se realizó un GSEA de genes relacionados con el crecimiento celular, pero este análisis concluyó que no existía ninguna diferencia entre las CMMs de estos dos grupos de sujetos. Estos datos indican una alteración a nivel génico de las CMMs de sujetos artrósicos en genes relacionados con diferenciación y desarrollo así como una tendencia más elevada hacia la apoptosis celular, lo que podría repercutir en un resultado menos satisfactorio en terapias celulares donde se usaran estas células. Sin embargo no se anotaron diferencias significativas entre los controles y los sujetos con artrosis en genes relacionados con inmunomodulación o inflamación. Esto indicaría que si las CMMs de artrosis fueran usadas en terapias celulares donde el objetivo no fuera únicamente la regeneración tisular sino el uso de estas células como agentes inmunomoduladores, las CMMs de artrosis podrían dar, probablemente, un resultado similar a las CMMs de sujetos control.

Dentro de los genes implicados en el **desarrollo tisular** que se vieron alterados en las CMMs de artrosis se encuentran la familia de genes de colágeno y la ruta de señalización IGF1.

Los colágenos y proteoglicanos, son dos de los componentes principales de la ECM. Los colágenos II, IX y XI son sintetizados mayoritariamente en reposo, por condrocitos proliferativos o maduros, donde los condrocitos hipertróficos sintetizan el colágeno X antes de que la mineralización de la ECM ocurra. La importancia de los colágenos en la formación de la matriz se ha observado en varias displasias esqueléticas^[141]. En

humanos la deficiencia del colágeno X se observa en la condrodisplasia metafisiaria de Schmid.

En este estudio se describe por primera vez la existencia de una asociación entre el gen *COL10A1* y la susceptibilidad a artrosis. Una disminución y/o defecto en la producción de colágeno X, que se ha observado en nuestro estudio, podría ser hipotéticamente responsable (al menos en parte) de una alteración y/o formación inestable del hueso subcondral. El hueso subcondral proporciona el soporte para el cartílago articular y una dañada ECM, y por tanto puede también afectar a la conformación de la articulación, induciendo la deformación del cartílago articular y de la superficie del hueso y creando áreas bajo tensión en el cartílago circundante.

De los tres SNPs estudiados en el gen *COL10A1*, sólo el genotipo TT del SNP **rs11965969**, se encontró asociado con susceptibilidad a artrosis. Las mutaciones en el gen *COL10A1* se han descrito en la condrodisplasia metafisiaria de Schmid^[141, 142], y sería posible que debido a la presencia de este SNP común en este gen, aparezca una enfermedad menos severa pero más prevalente como es la artrosis.

El otro componente del desarrollo tisular es la ruta de señalización de **IGF1** que está implicada críticamente en la regulación de la formación de cartílago y hueso. IGF1, es un análogo estructural y funcional de la insulina que promueve la proliferación y diferenciación de los condrocitos mientras inhibe su apoptosis^[143, 144]. La importancia de IGF1 en artrosis ha sido revisada múltiples veces en estudios enfocados a discernir la relación entre los cambios radiológicos relacionados con artrosis y genotipos específicos de *IGF1*^[145, 146]. Se han identificado varios polimorfismos^[147-149] en el gen *IGF1* (mapa de localización 12q22-q24.1) y en el extremo 5' de la región promotora que se extiende hasta 1.630 bp anteriores al lugar de inicio de la transcripción del exón 1^[150-153]. Se ha demostrado una relación entre artrosis y los SNPs. En el estudio Artrosis y Estilo de Vida (GARTROSISL), se intentó replicar los hallazgos publicados sobre *IGF1* que tenían una asociación genética con la artrosis y se examinó el papel de la variación genética de este gen entre otros genes asociados a la artrosis. La conclusión final del estudio era la falta de replicación entre todos los hallazgos publicados debido a las probables diferencias en el diseño de los estudios, de los fenotipos analizados, de las poblaciones examinadas o los falsos positivos detectados en las fases iniciales. En el caso de *IGF1*, solamente el SNP rs2195239 pudo ser asociado con un aumento del

riesgo de sufrir artrosis de cadera pero la evidencia de esta asociación se redujo al limitar el análisis con sujetos control sin signos radiográficos de artrosis^[154].

Por otra parte, el polimorfismo de *IGF1* más estudiado es -841 CA-repetida/192 bp (polimorfismo alélico de 192 bp), que está localizado en la región promotora. Se ha asociado este conocido polimorfismo a un menor tamaño de nacimiento, estatura baja en adultos, aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus y bajos niveles de IGF1 circulantes^[155-160]. Sin embargo los datos publicados son contradictorios. Por ejemplo, en referencia a los niveles de IGF1, en un estudio de Canzian y col, no se mostró ninguna correlación en los niveles plasmáticos de IGF1 y este polimorfismo en mujeres caucásicas^[161], aunque Palles y col., señalaron el impacto de este polimorfismo en niveles de IGF1 circulantes analizados en mujeres de mediana edad^[162]. El polimorfismo alélico de 192 bp y el polimorfismo analizado en este estudio, el **SNP G1245A (rs35767)** están localizados en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento. Desde el punto de vista técnico, el estudio de dicho polimorfismo como marcador alélico de 192 bp es más sencillo y se necesita menos cantidad de material genético (HapMap, <http://www.hapmap.org>)^[121, 163].

El estudio llevado a cabo en este trabajo es el primero en el que demuestra la relación entre los niveles séricos de IGF1, el riesgo de desarrollo o severidad de la artrosis de cadera y el SNP rs35767 de *IGF1* en población española. Es un punto destacable, que todos los pacientes analizados en este estudios, estaban caracterizados complemente con la escala radiológica KL y los tres índices de severidad de la artrosis y funcionalidad: WOMAC, LEQUESNE y HAQ.

Sin embargo, como se indica anteriormente, existe controversia acerca de esta asociación. En estudios de cohortes multiétnicas, D'Aloisio y col.^[164] y Cheng y col.^[165], no encontraron ninguna asociación entre este SNP y niveles plasmáticos de IGF1, mientras que los autores Patel y col.^[166] indicaron que existía una asociación entre rs35767 y niveles circulantes de IGF1 en mujeres caucásicas. Además, en este trabajo, hemos encontrado una correlación entre los niveles séricos de IGF1 y la severidad de la artrosis evaluada mediante el grado radiológico KL. Denko y col. junto con McAlindon y col.^[167-169] observaron bajos niveles séricos de IGF1 en pacientes artrósicos pero no encontraron asociaciones ni entre estos niveles y la incidencia o progresión de la artrosis, ni entre los niveles séricos de IGF1 y cualquier forma de

artrosis. A pesar de estos resultados, en otros estudios se ha descrito una asociación leve entre los niveles de IGF1 y la artrosis en interfalanges distales y artrosis de rodilla bilateral^[170].

Otro abordaje con la finalidad de analizar el posible uso de estas células en terapia celular fue el estudio de las propiedades de regeneración tisular en pacientes artrósicos. Nuestros resultados indicaron que estas células mantienen intactas sus propiedades inmunomoduladoras.

Mediante el estudio de la expresión y secreción de factores inmunomoduladores y de crecimiento, se estudió la capacidad de inmunomodulación de las CMMs. Para una aplicación clínica aceptable, consideramos que las CMMs deberían poder modular la inflamación o respuesta inmune al menos durante varias semanas y por lo tanto, mantenerse viables, para garantizar la mejora de la patología. Sin embargo, se sabe que la administración sistémica de las CMMs se caracteriza por una muerte temprana de las células introducidas o por un bajo porcentaje de células que alcanzan la diana terapéutica para la que fueron introducidas^[73-77]. Para reducir el porcentaje de muerte celular y dirigir lo máximo posible las CMMs hacia la diana terapéutica concreta, en este caso la articulación de la rodilla y la cadera, decidimos usar un vehículo de liberación para las CMMs. Elegimos embeber las CMMs de artrosis en alginato, que es un polímero natural, muy útil para encapsular células debido a su biocompatibilidad y su estabilidad *in vivo*^[171-173]. Las ventajas de usar una matriz de alginato son que es una forma fácil de prevenir el estrés mecánico, de disminuir la influencia negativa del ambiente de la lesión, es sencilla de manipular e introducir cerca de la lesión y proporciona una forma fácil de localizar las células introducidas^[174]. Para asemejarse al entorno encontrado en una articulación artrósica, añadimos factores proinflamatorios con el fin de activar las propiedades inmunomoduladoras de las CMMs.

Los resultados obtenidos demostraron que las CMMs embebidas en alginato son capaces de sobrerregular la expresión de *IDO* e *IL6* después de ser estimuladas por un tratamiento proinflamatorio a base de IFN γ and TNF α . De esta manera se confirman los estudios previos de CMMs cultivadas en monocapa^[101, 175, 176]. Estos datos abren la posibilidad a la creación de un sistema de duración prolongado de liberación de factores inmunomoduladores basado en la encapsulación de CMMs en alginato.

La capacidad inmunomoduladora demostrada en este análisis, concuerda con las observaciones en otros estudios ^[177-179] que demostraron que la inmunosupresión de las CMMs mediada por IDO tenía un efecto positivo en un modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE). Por otra parte, la IL6 tiene efectos contrapuestos: ejerce un papel antiinflamatorio, controlando la extensión de la inflamación aguda ^[180, 181], y por el contrario en modelos de artritis experimentales como la artritis inducida por colágeno, o enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis murina o la EAE ^[182], su función parece tener efectos proinflamatorios, ^[183]. El mantenimiento de la expresión génica de *TIMP1* y *TIMP2* observada, también podría actuar localmente y regular la desestructuración de la ECM inducida por MMP ^[184]. En contraste con otros estudios, en nuestro estudio hemos observado una menor expresión génica de *VEGF* tras el tratamiento con IFN γ y TNF α , disminución que correlacionaba con una menor expresión de *TGF β 1*. En el campo de la inmunomodulación, *TGF β 1* ha sido ampliamente asociado con la supresión del mecanismo de inmunovigilancia ^[68, 185] y su incremento de expresión prolongado conlleva a una severa hiperplasia en la epidermis y/o en la mucosa oral ^[186-188]. Los niveles de VEGF se pueden correlacionar con los procesos de angiogénesis, necesarios en los procesos de reparación tisular, pero el incremento de VEGF puede conducir a inflamación ^[189]. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que las CMMs mantienen su capacidad de secretar factores moduladores de la respuesta inmune tras ser encapsuladas en una matriz de alginato y cultivadas hasta 30 días después.

No obstante, el estudio presenta varias limitaciones. El grupo control era significativamente más joven que el grupo de pacientes artrósicos, aunque el modelo fue ajustado por esta variable. Sin embargo y aunque los sujetos control no presentaban ningún tipo de enfermedad musculoesquelética en el momento de la extracción de sangre, es probable que algunos de ellos desarrollen artrosis en el futuro. El grupo control también presentaban un mayor porcentaje de hombres, lo cual puede ser importante debido que existen varias asociaciones entre el rs35767 de *IGF1* y niveles de IGF1 en sujetos de sexo femenino. Aún así, se observaron las mismas tendencias en hombres y mujeres y se ajustó el resultado por la variable sexo. Otros factores de confusión como el índice de masa corporal (BMI) no se tuvieron en cuenta en el análisis debido a su falta de disponibilidad.

En referencia al estudio de las propiedades inmunomoduladoras de las CMMs de artrosis, a pesar de que las CMMs mantienen sus propiedades inmunomoduladoras a lo largo de los 30 días de cultivo en alginato, más de la mitad de las CMMs murieron a lo largo del experimento y las restantes, mostraron una disminución en su capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica. Estos datos son discordantes con otros estudios. Estas diferencias pueden deberse al tipo de alginato usado. En nuestro estudio, la encapsulación de las CMMs se realizó en alginato de baja viscosidad al 1,2%, solidificado gota a gota en tampón CaCl_2 , usando una aguja de calibre 23G. Este método ya se había utilizado satisfactoriamente en nuestro laboratorio con la finalidad de diferenciar condrogenicamente las CMMs o para cultivar condrocitos y obtener una matriz de cartílago^[190-193]. Otros estudios han mostrado una viabilidad mayor a los 21 días de cultivo en alginato^[194] así como un incremento de los marcadores osteogénicos: osteocalcina y ostemodulina, y del adipogénico (PPAR γ)^[195-199]. En estos estudios se utilizó alginato modificado covalentemente con el tripeptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). El alginato RGD mejora la adherencia celular^[195], lo cual, parece ser crucial para la supervivencia de las CMMs cuando no van a diferenciarse condrogenicamente. En nuestro estudio, las células supervivientes, presentaron una reducida capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica. En la mayor parte de los experimentos, las células no lograron adherirse a la placa después de su paso por alginato y no se pudo realizar con éxito la fase de diferenciación celular.

Finalmente, como conclusión cabe destacar que nuestros hallazgos proporcionan un conjunto de datos de referencia relacionados con funciones esenciales para la biología normal de las CMMs, que aparecen alterados en artrosis. Basados en la función de las proteínas codificadas por estos genes, nuestros resultados sugieren una disminución general de los potenciales de diferenciación y regeneración en pacientes con artrosis.

Los resultados mostrados en este trabajo indican que los cambios biológicos que tienen lugar en la artrosis podrían relacionarse, al menos de forma parcial con los defectos de formación de la ECM y del hueso subcondral, una estructura esencial para el mantenimiento de la estabilidad articular.

Teniendo en cuenta que la artrosis es una enfermedad degenerativa de la articulación caracterizada por una degradación del cartílago articular, la inflamación sinovial y la esclerosis ósea y que carece de un tratamiento que evite su aparición o progresión, su

diagnóstico y tratamiento en las fases más tempranas de la patología es vital para retrasar o evitar su desarrollo. En este contexto, los hallazgos encontrados en los niveles séricos de IGF1 junto con los datos del SNP asociado rs35767, pueden suponer parámetros importantes a la hora del diagnóstico temprano de la enfermedad. Además este marcador puede a su vez ser un factor discriminador de las artrosis de rodilla o cadera.

No obstante, basándonos solamente en el análisis genético de datos, es difícil evaluar si los cambios observados están presentes desde el inicio o son consecuencia del mismo proceso patogénico. Por tanto es necesaria una validación futura de estos resultados.

Respecto a la aplicación clínica de las CMMs tanto en trasplantes autólogos o alogénicos, el uso de matrices como la aquí utilizada de alginato puede ser muy útil. Este tipo de matriz puede utilizarse de forma segura y efectiva para introducir CMMs de manera percutánea^[194, 200] y actuar como un sistema de liberación de factores de secreción durante semanas o meses sin riesgo de invasión celular a tejidos adyacentes.

CONCLUSIONES

7. Los resultados obtenidos mediante un análisis de microarray del genoma completo de CMMs de sujetos artrósicos muestran alteraciones en el perfil de expresión génica de las CMMs de pacientes artrósicos en comparación con CMMs de sujetos control.
8. Los genes que principalmente se encontraron infraregulados en CMMs de artrosis pertenecían a categorías funcionales relacionadas con el desarrollo y la diferenciación celular, como el *COL10A1* e *IGF1*, mientras que los genes que se encontraron sobrerregulados en CMMs de artrosis estaban relacionados con apoptosis celular.
9. Los datos indican la existencia de una asociación genética entre el SNP rs11965969 en el gen de *COL10A1* en pacientes artrósicos.
10. Este estudio sugiere una relación entre los niveles séricos de IGF1, el riesgo de desarrollo o severidad de la artrosis de cadera y el SNP rs35767 de *IGF1* en población española.
11. No se encontraron diferencias entre las características inmunomoduladoras de las CMMs de pacientes de artrosis y las CMMs de sujetos control.
12. Las CMMs de pacientes artrósicos, tras un periodo de 30 días en una matriz de alginato, mantienen la expresión de genes relacionados con la capacidad inmunomoduladora.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mueller, MB y Tuan, RS. *Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets*. PM R. 3(6 Suppl 1): p. S3-11.
2. Baker-Lepain, JC y Lane, NE. *Role of bone architecture and anatomy in osteoarthritis*. Bone.
3. Wieland, HA, Michaelis, M, Kirschbaum, BJ, y col. *Osteoarthritis - an untreatable disease?* Nat Rev Drug Discov, 2005. 4(4): p. 331-44.
4. Vidal, J, Benito, P, Manresa, A, y col. *[Economic evaluation of tramadol/paracetamol in the management of pain in patients with osteoarthritis in Spain]*. Reumatol Clin. 7(4): p. 241-7.
5. Rousseau, JC y Delmas, PD. *Biological markers in osteoarthritis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. 3(6): p. 346-56.
6. Murray, CJ y Lopez, AD. *Regional patterns of disability-free life expectancy and disability-adjusted life expectancy: global Burden of Disease Study*. Lancet, 1997. 349(9062): p. 1347-52.
7. Carmona, L, Ballina, J, Gabriel, R, y col. *The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey*. Ann Rheum Dis, 2001. 60(11): p. 1040-5.
8. Loza, E, Lopez-Gomez, JM, Abasolo, L, y col. *Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain*. Arthritis Rheum, 2009. 61(2): p. 158-65.
9. Manek, NJ y Lane, NE. *Osteoarthritis: current concepts in diagnosis and management*. Am Fam Physician, 2000. 61(6): p. 1795-804.
10. Altman, R, Asch, E, Bloch, D, y col. *Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association*. Arthritis Rheum, 1986. 29(8): p. 1039-49.
11. Altman, R, Alarcon, G, Appelrouth, D, y col. *The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip*. Arthritis Rheum, 1991. 34(5): p. 505-14.
12. Gerwin, N, Hops, C y Lucke, A. *Intraarticular drug delivery in osteoarthritis*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(2): p. 226-42.
13. TSAOG. *Cartilage TX*. 2012 [cited 2012 12-05-2012]; Available from: <http://www.tsaog.com/CartilageTX/cartilageMain.asp?pageNo=11>.
14. Forriol Campos, F. *El cartílago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular* Revista de Ortopedia y Traumatología, 2002. 46(5): p. 380-90..
15. Brandt, KD, Radin, EL, Dieppe, PA, y col. *Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease*. Ann Rheum Dis, 2006. 65(10): p. 1261-4.
16. Dieppe, P. *Subchondral bone should be the main target for the treatment of pain and disease progression in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. 7(3): p. 325-6.
17. Valdes, AM y Spector, TD. *The genetic epidemiology of osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol. 22(2): p. 139-43.
18. Sandell, LJ. *Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development*. Nat Rev Rheumatol. 8(2): p. 77-89.
19. Spector, TD, Cicuttini, F, Baker, J, y col. *Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study*. BMJ, 1996. 312(7036): p. 940-3.
20. Bijkerk, C, Houwing-Duistermaat, JJ, Valkenburg, HA, y col. *Heritabilities of radiologic osteoarthritis in peripheral joints and of disc degeneration of the spine*. Arthritis Rheum, 1999. 42(8): p. 1729-35.
21. Jordan, JM, Kraus, VB y Hochberg, MC. *Genetics of osteoarthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2004. 6(1): p. 7-13.
22. Fritz, V, Noel, D, Bouquet, C, y col. *Antitumoral activity and osteogenic potential of mesenchymal stem cells expressing the urokinase-type plasminogen antagonist amino-terminal fragment in a murine model of osteolytic tumor*. Stem Cells, 2008. 26(11): p. 2981-90.
23. Valdes, AM, Doherty, M y Spector, TD. *The additive effect of individual genes in predicting risk of knee osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. 67(1): p. 124-7.
24. Zheng, ZH, Li, XY, Ding, J, y col. *Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2008. 47(1): p. 22-30.
25. Ikegawa, S. *New gene associations in osteoarthritis: what do they provide, and where are we going?* Curr Opin Rheumatol, 2007. 19(5): p. 429-34.
26. Miyamoto, Y, Shi, D, Nakajima, M, y col. *Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis*. Nat Genet, 2008. 40(8): p. 994-8.
27. Atif, U, Philip, A, Aponte, J, y col. *Absence of association of asporin polymorphisms and osteoarthritis susceptibility in US Caucasians*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. 16(10): p. 1174-7.

28. Valdes, AM, Spector, TD, Doherty, S, y col. *Association of the DVWA and GDF5 polymorphisms with osteoarthritis in UK populations*. Ann Rheum Dis, 2009. 68(12): p. 1916-20.
29. Vaes, RB, Rivadeneira, F, Kerkhof, JM, y col. *Genetic variation in the GDF5 region is associated with osteoarthritis, height, hip axis length and fracture risk: the Rotterdam study*. Ann Rheum Dis, 2009. 68(11): p. 1754-60.
30. Kerkhof, JM, Uitterlinden, AG, Valdes, AM, y col. *Radiographic osteoarthritis at three joint sites and FRZB, LRP5, and LRP6 polymorphisms in two population-based cohorts*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. 16(10): p. 1141-9.
31. Mier, RJ, Holderbaum, D, Ferguson, R, y col. *Osteoarthritis in children associated with a mutation in the type II procollagen gene (COL2A1)*. Mol Genet Metab, 2001. 74(3): p. 338-41.
32. Reginato, AM y Olsen, BR. *The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders*. Arthritis Res, 2002. 4(6): p. 337-45.
33. Dabovic, B, Chen, Y, Colarossi, C, y col. *Bone defects in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice; a role for Ltbp in TGF-beta presentation*. J Endocrinol, 2002. 175(1): p. 129-41.
34. Blair-Levy, JM, Watts, CE, Fiorentino, NM, y col. *A type I collagen defect leads to rapidly progressive osteoarthritis in a mouse model*. Arthritis Rheum, 2008. 58(4): p. 1096-106.
35. Valdes, AM y Spector, TD. *The contribution of genes to osteoarthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2008. 34(3): p. 581-603.
36. Loughlin, J, Dowling, B, Mustafa, Z, y col. *Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2002. 46(6): p. 1519-27.
37. Valdes, AM, Loughlin, J, Timms, KM, y col. *Genome-wide association scan identifies a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 variant involved in risk of knee osteoarthritis*. Am J Hum Genet, 2008. 82(6): p. 1231-40.
38. Samuels, J, Krasnokutsky, S y Abramson, SB. *Osteoarthritis: a tale of three tissues*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2008. 66(3): p. 244-50.
39. Kawaguchi, H. *Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models*. Mol Cells, 2008. 25(1): p. 1-6.
40. Abramson, SB y Attur, M. *Developments in the scientific understanding of osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2009. 11(3): p. 227.
41. Kandel, RA, Dinarello, CA y Biswas, C. *The stimulation of collagenase production in rabbit articular chondrocytes by interleukin-1 is increased by collagens*. Biochem Int, 1987. 15(5): p. 1021-31.
42. Bettica, P, Cline, G, Hart, DJ, y col. *Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study*. Arthritis Rheum, 2002. 46(12): p. 3178-84.
43. Walsh, DA, Bonnet, CS, Turner, EL, y col. *Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. 15(7): p. 743-51.
44. Pelletier, JP, Martel-Pelletier, J y Abramson, SB. *Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets*. Arthritis Rheum, 2001. 44(6): p. 1237-47.
45. Fendrick, AM y Greenberg, BP. *A review of the benefits and risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of mild-to-moderate osteoarthritis*. Osteopath Med Prim Care, 2009. 3: p. 1.
46. Conaghan, PG, Dickson, J y Grant, RL. *Care and management of osteoarthritis in adults: summary of NICE guidance*. BMJ, 2008. 336(7642): p. 502-3.
47. Bruder, SP, Jaiswal, N y Haynesworth, SE. *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J Cell Biochem, 1997. 64(2): p. 278-94.
48. Pittenger, MF, Mackay, AM, Beck, SC, y col. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. 284(5411): p. 143-7.
49. Pessina, A y Gribaldo, L. *The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives*. Curr Med Res Opin, 2006. 22(11): p. 2287-300.
50. Meregalli M, FA, Torrente Y. *Mesenchymal Stem Cells as Muscle Reservoir*. J Stem Cell Res Ther, 2011. 2: p. 105.
51. Sottile, V, Halleux, C, Bassilana, F, y col. *Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells*. Bone, 2002. 30(5): p. 699-704.
52. Lee, OK, Kuo, TK, Chen, WM, y col. *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. Blood, 2004. 103(5): p. 1669-75.

53. Awad, HA, Wickham, MQ, Leddy, HA, y col. *Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds*. Biomaterials, 2004. 25(16): p. 3211-22.
54. De Angelis, L, Berghella, L, Coletta, M, y col. *Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration*. J Cell Biol, 1999. 147(4): p. 869-78.
55. Otto, WR y Wright, NA. *Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic*. Fibrogenesis Tissue Repair. 4: p. 20.
56. Dominici, M, Le Blanc, K, Mueller, I, y col. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. 8(4): p. 315-7.
57. Gregory, CA, Ylostalo, J y Prockop, DJ. *Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate*. Sci STKE, 2005. 2005(294): p. pe37.
58. Falanga, V, Iwamoto, S, Chartier, M, y col. *Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds*. Tissue Eng, 2007. 13(6): p. 1299-312.
59. Hsieh, JY, Fu, YS, Chang, SJ, y col. *Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord*. Stem Cells Dev. 19(12): p. 1895-910.
60. Weiss, ML, Anderson, C, Medicetty, S, y col. *Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells*. Stem Cells, 2008. 26(11): p. 2865-74.
61. Jakob, M, Hemeda, H, Janeschik, S, y col. *Human nasal mucosa contains tissue-resident immunologically responsive mesenchymal stromal cells*. Stem Cells Dev. 19(5): p. 635-44.
62. Lanzoni, G, Alviano, F, Marchionni, C, y col. *Isolation of stem cell populations with trophic and immunoregulatory functions from human intestinal tissues: potential for cell therapy in inflammatory bowel disease*. Cytotherapy, 2009. 11(8): p. 1020-31.
63. Polisetty, N, Fatima, A, Madhira, SL, y col. *Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye*. Mol Vis, 2008. 14: p. 431-42.
64. Brune, JC, Tormin, A, Johansson, MC, y col. *Mesenchymal stromal cells from primary osteosarcoma are non-malignant and strikingly similar to their bone marrow counterparts*. Int J Cancer. 129(2): p. 319-30.
65. Ortiz, LA, Dutreil, M, Fattman, C, y col. *Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(26): p. 11002-7.
66. Kunter, U, Rong, S, Djuric, Z, y col. *Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(8): p. 2202-12.
67. Minguell, JJ y Erices, A. *Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. 231(1): p. 39-49.
68. Lee, RH, Seo, MJ, Reger, RL, y col. *Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(46): p. 17438-43.
69. Phinney, DG y Isakova, I. *Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system*. Curr Pharm Des, 2005. 11(10): p. 1255-65.
70. Olson, SD, Pollock, K, Kambal, A, y col. *Genetically engineered mesenchymal stem cells as a proposed therapeutic for Huntington's disease*. Mol Neurobiol. 45(1): p. 87-98.
71. Le Blanc, K. *Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation*. Cytotherapy, 2006. 8(6): p. 559-61.
72. Myers, TJ, Granero-Molto, F, Longobardi, L, y col. *Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy*. Expert Opin Biol Ther. 10(12): p. 1663-79.
73. Maurel, A, Hernandez, C, Kunduzova, O, y col. *Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 284(4): p. H1460-7.
74. Muller-Ehmsen, J, Whittaker, P, Kloner, RA, y col. *Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2002. 34(2): p. 107-16.
75. Reinecke, H, Zhang, M, Bartosek, T, y col. *Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts*. Circulation, 1999. 100(2): p. 193-202.

76. Tambara, K, Sakakibara, Y, Sakaguchi, G, y col. *Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers*. Circulation, 2003. 108 Suppl 1: p. II259-63.
77. Toma, C, Pittenger, MF, Cahill, KS, y col. *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart*. Circulation, 2002. 105(1): p. 93-8.
78. Prockop, DJ. *"Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs)*. Clin Pharmacol Ther, 2007. 82(3): p. 241-3.
79. Djouad, F, Mrugala, D, Noel, D, y col. *Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair*. Regen Med, 2006. 1(4): p. 529-37.
80. Kinnaird, T, Stabile, E, Burnett, MS, y col. *Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms*. Circ Res, 2004. 94(5): p. 678-85.
81. Gneocchi, M, He, H, Noiseux, N, y col. *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement*. FASEB J, 2006. 20(6): p. 661-9.
82. Hoogduijn, MJ, Popp, F, Verbeek, R, y col. *The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy*. Int Immunopharmacol. 10(12): p. 1496-500.
83. Groh, ME, Maitra, B, Szekely, E, y col. *Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells*. Exp Hematol, 2005. 33(8): p. 928-34.
84. Le Blanc, K, Tammik, L, Sundberg, B, y col. *Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex*. Scand J Immunol, 2003. 57(1): p. 11-20.
85. Ren, G, Zhang, L, Zhao, X, y col. *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide*. Cell Stem Cell, 2008. 2(2): p. 141-50.
86. Comoli, P, Ginevri, F, Maccario, R, y col. *Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation*. Nephrol Dial Transplant, 2008. 23(4): p. 1196-202.
87. Nauta, AJ, Kruisselbrink, AB, Lurvink, E, y col. *Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol, 2006. 177(4): p. 2080-7.
88. Di Nicola, M, Carlo-Stella, C, Magni, M, y col. *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood, 2002. 99(10): p. 3838-43.
89. Krampera, M, Glennie, S, Dyson, J, y col. *Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide*. Blood, 2003. 101(9): p. 3722-9.
90. Parekkadan, B, Tilles, AW y Yarmush, ML. *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells*. Stem Cells, 2008. 26(7): p. 1913-9.
91. Popp, FC, Eggenhofer, E, Renner, P, y col. *Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate*. Transpl Immunol, 2008. 20(1-2): p. 55-60.
92. Bartholomew, A, Sturgeon, C, Siatskas, M, y col. *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo*. Exp Hematol, 2002. 30(1): p. 42-8.
93. Gonzalez-Rey, E, Anderson, P, Gonzalez, MA, y col. *Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis*. Gut, 2009. 58(7): p. 929-39.
94. Jorgensen, C, Djouad, F, Bouffi, C, y col. *Multipotent mesenchymal stromal cells in articular diseases*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008. 22(2): p. 269-84.
95. Ghosh, S, May, MJ y Kopp, EB. *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 225-60.
96. Tsatsanis, C, Androulidaki, A, Venihaki, M, y col. *Signalling networks regulating cyclooxygenase-2*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. 38(10): p. 1654-61.
97. Zhang, X, Schwarz, EM, Young, DA, y col. *Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair*. J Clin Invest, 2002. 109(11): p. 1405-15.
98. Bonney, EA y Matzinger, P. *Much IDO about pregnancy*. Nat Med, 1998. 4(10): p. 1128-9.
99. Munn, DH, Zhou, M, Attwood, JT, y col. *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*. Science, 1998. 281(5380): p. 1191-3.
100. Jiang, XX, Zhang, Y, Liu, B, y col. *Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells*. Blood, 2005. 105(10): p. 4120-6.

101. Meisel, R, Zibert, A, Laryea, M, y col. *Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation*. Blood, 2004. 103(12): p. 4619-21.
102. Wang, XJ, Dong, Z, Zhong, XH, y col. *Transforming growth factor-beta1 enhanced vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. 365(3): p. 548-54.
103. Mallat, Z y Tedgui, A. *The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives*. Curr Opin Lipidol, 2002. 13(5): p. 523-9.
104. Lane, JM, Yasko, AW, Tomin, E, y col. *Bone marrow and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osseous repair*. Clin Orthop Relat Res, 1999(361): p. 216-27.
105. Ringe, J y Sittlinger, M. *Tissue engineering in the rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2009. 11(1): p. 211.
106. Aranguren, XL, Verfaillie, CM y Luttun, A. *Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease*. J Mol Med (Berl), 2009. 87(1): p. 3-16.
107. Germani, A, Di Campi, C, Pompilio, G, y col. *Regenerative therapy in peripheral artery disease*. Cardiovasc Ther, 2009. 27(4): p. 289-304.
108. Bieback, K y Kluter, H. *Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood*. Curr Stem Cell Res Ther, 2007. 2(4): p. 310-23.
109. Murphy, JM, Dixon, K, Beck, S, y col. *Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2002. 46(3): p. 704-13.
110. Scharstuhl, A, Schewe, B, Benz, K, y col. *Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology*. Stem Cells, 2007. 25(12): p. 3244-51.
111. Kafienah, W, Mistry, S, Dickinson, SC, y col. *Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients*. Arthritis Rheum, 2007. 56(1): p. 177-87.
112. Prockop, DJ y Olson, SD. *Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions*. Blood, 2007. 109(8): p. 3147-51.
113. Herberts, CA, Kwa, MS y Hermesen, HP. *Risk factors in the development of stem cell therapy*. J Transl Med. 9: p. 29.
114. Panetta, NJ, Gupta, DM, Quarto, N, y col. *Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering*. Panminerva Med, 2009. 51(1): p. 25-41.
115. Augst, AD, Kong, HJ y Mooney, DJ. *Alginate hydrogels as biomaterials*. Macromol Biosci, 2006. 6(8): p. 623-33.
116. El-Ghannam, A y Ning, CQ. *Effect of bioactive ceramic dissolution on the mechanism of bone mineralization and guided tissue growth in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2006. 76(2): p. 386-97.
117. Kellgren, JH y Lawrence, JS. *Radiological assessment of osteo-arthritis*. Ann Rheum Dis, 1957. 16(4): p. 494-502.
118. Royce, PM y Lowther, DA. *Fluorimetric determination of DNA in papain digests of cartilage, using ethidium bromide*. Connect Tissue Res, 1979. 6(4): p. 215-21.
119. Bolstad, B. M. (2001). *Probe level quantile normalization of high density oligonucleotide array data*. Unpublished Manuscript: <http://bmbolstad.com/stuff/qnorm.pdf>. 2001.
120. Bolstad B. M., Irizarry R. A., Åstrand M., Speed T. P. (2003) *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics.19: 185-193. 2003.
121. Ester, WA, van Meurs, JB, Arends, NJ, y col. *The -G1245A IGF1 polymorphism is related with small head size and less brain sparing in small for gestational age born children*. Eur J Endocrinol, 2009. 160(4): p. 549-55.
122. Carmona-Saez, P, Chagoyen, M, Tirado, F, y col. *GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists*. Genome Biol, 2007. 8(1): p. R3.
123. Nogales-Cadenas, R, Carmona-Saez, P, Vazquez, M, y col. *GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(Web Server issue): p. W317-22.
124. Subramanian, A, Tamayo, P, Mootha, VK, y col. *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(43): p. 15545-50.
125. Zheng, Q, Zhou, G, Morello, R, y col. *Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo*. J Cell Biol, 2003. 162(5): p. 833-42.
126. Giachelli, CM y Steitz, S. *Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization*. Matrix Biol, 2000. 19(7): p. 615-22.

127. Alfaro, MP, Pagni, M, Vincent, A, y col. *The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(47): p. 18366-71.
128. Tamamura, Y, Otani, T, Kanatani, N, y col. *Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification*. J Biol Chem, 2005. 280(19): p. 19185-95.
129. Day, TF, Guo, X, Garrett-Beal, L, y col. *Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis*. Dev Cell, 2005. 8(5): p. 739-50.
130. Christodoulides, C, Lagathu, C, Sethi, JK, y col. *Adipogenesis and WNT signalling*. Trends Endocrinol Metab, 2009. 20(1): p. 16-24.
131. Baksh, D, Boland, GM y Tuan, RS. *Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation*. J Cell Biochem, 2007. 101(5): p. 1109-24.
132. Zhu, M, Tang, D, Wu, Q, y col. *Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice*. J Bone Miner Res, 2009. 24(1): p. 12-21.
133. Yoshida, CA y Komori, T. *Role of Runx proteins in chondrogenesis*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2005. 15(3): p. 243-54.
134. Ito, Y y Miyazono, K. *RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling*. Curr Opin Genet Dev, 2003. 13(1): p. 43-7.
135. Soung do, Y, Dong, Y, Wang, Y, y col. *Runx3/AML2/Cbfa3 regulates early and late chondrocyte differentiation*. J Bone Miner Res, 2007. 22(8): p. 1260-70.
136. Dominguez-Soto, A, Relloso, M, Vega, MA, y col. *RUNX3 regulates the activity of the CD11a and CD49d integrin gene promoters*. Immunobiology, 2005. 210(2-4): p. 133-9.
137. Sperber, SM y Dawid, IB. *barx1 is necessary for ectomesenchyme proliferation and osteochondroprogenitor condensation in the zebrafish pharyngeal arches*. Dev Biol, 2008. 321(1): p. 101-10.
138. Friedman, MS, Oyserman, SM y Hankenson, KD. *Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2*. J Biol Chem, 2009. 284(21): p. 14117-25.
139. Kim, KA, Wagle, M, Tran, K, y col. *R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism*. Mol Biol Cell, 2008. 19(6): p. 2588-96.
140. Brott, BK y Sokol, SY. *Frodo proteins: modulators of Wnt signaling in vertebrate development*. Differentiation, 2005. 73(7): p. 323-9.
141. Newman, B y Wallis, GA. *Skeletal dysplasias caused by a disruption of skeletal patterning and endochondral ossification*. Clin Genet, 2003. 63(4): p. 241-51.
142. Bateman, JF, Wilson, R, Freddi, S, y col. *Mutations of COL10A1 in Schmid metaphyseal chondrodysplasia*. Hum Mutat, 2005. 25(6): p. 525-34.
143. Hutchison, MR, Bassett, MH y White, PC. *Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone, affect growth plate chondrocyte proliferation*. Endocrinology, 2007. 148(7): p. 3122-30.
144. Kiepe, D, Ciarmatori, S, Haarmann, A, y col. *Differential expression of IGF system components in proliferating vs. differentiating growth plate chondrocytes: the functional role of IGFBP-5*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. 290(2): p. E363-71.
145. Meulenbelt, I, Bijkerk, C, Miedema, HS, y col. *A genetic association study of the IGF-1 gene and radiological osteoarthritis in a population-based cohort study (the Rotterdam Study)*. Ann Rheum Dis, 1998. 57(6): p. 371-4.
146. Zhai, G, Rivadeneira, F, Houwing-Duistermaat, JJ, y col. *Insulin-like growth factor I gene promoter polymorphism, collagen type II alpha1 (COL2A1) gene, and the prevalence of radiographic osteoarthritis: the Rotterdam Study*. Ann Rheum Dis, 2004. 63(5): p. 544-8.
147. Polymeropoulos, MH, Rath, DS, Xiao, H, y col. *Dinucleotide repeat polymorphism at the human gene for insulin-like growth factor I (IGFI)*. Nucleic Acids Res, 1991. 19(20): p. 5797.
148. Rotwein, P, Pollock, KM, Didier, DK, y col. *Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides*. J Biol Chem, 1986. 261(11): p. 4828-32.
149. Rasmussen, SK, Lautier, C, Hansen, L, y col. *Studies of the variability of the genes encoding the insulin-like growth factor I receptor and its ligand in relation to type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(4): p. 1606-10.
150. Jansen, E, Steenbergh, PH, van Schaik, FM, y col. *The human IGF-I gene contains two cell type-specifically regulated promoters*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 187(3): p. 1219-26.

151. Steenbergh, PH, Jansen, E, van Schaik, FM, y col. *Functional analysis of the human IGF-I gene promoters*. Mol Reprod Dev, 1993. 35(4): p. 365-7.
152. Kim, SW, Lajara, R y Rotwein, P. *Structure and function of a human insulin-like growth factor-I gene promoter*. Mol Endocrinol, 1991. 5(12): p. 1964-72.
153. Mittanck, DW, Kim, SW y Rotwein, P. *Essential promoter elements are located within the 5' untranslated region of human insulin-like growth factor-I exon I*. Mol Cell Endocrinol, 1997. 126(2): p. 153-63.
154. Limer, KL, Tosh, K, Bujac, SR, y col. *Attempt to replicate published genetic associations in a large, well-defined osteoarthritis case-control population (the GOAL study)*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. 17(6): p. 782-9.
155. Vaessen, N, Heutink, P, Janssen, JA, y col. *A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction*. Diabetes, 2001. 50(3): p. 637-42.
156. Vaessen, N, Janssen, JA, Heutink, P, y col. *Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birthweight*. Lancet, 2002. 359(9311): p. 1036-7.
157. Rietveld, I, Janssen, JA, Hofman, A, y col. *A polymorphism in the IGF-I gene influences the age-related decline in circulating total IGF-I levels*. Eur J Endocrinol, 2003. 148(2): p. 171-5.
158. Rietveld, I, Janssen, JA, van Rossum, EF, y col. *A polymorphic CA repeat in the IGF-I gene is associated with gender-specific differences in body height, but has no effect on the secular trend in body height*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. 61(2): p. 195-203.
159. Frayling, TM, Hattersley, AT, McCarthy, A, y col. *A putative functional polymorphism in the IGF-I gene: association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in U.K. populations*. Diabetes, 2002. 51(7): p. 2313-6.
160. Day, IN, King, TH, Chen, XH, y col. *Insulin-like growth factor-I genotype and birthweight*. Lancet, 2002. 360(9337): p. 945; author reply 45-6.
161. Canzian, F, McKay, JD, Cleveland, RJ, y col. *Polymorphisms of genes coding for insulin-like growth factor 1 and its major binding proteins, circulating levels of IGF-I and IGFBP-3 and breast cancer risk: results from the EPIC study*. Br J Cancer, 2006. 94(2): p. 299-307.
162. Palles, C, Johnson, N, Coupland, B, y col. *Identification of genetic variants that influence circulating IGF1 levels: a targeted search strategy*. Hum Mol Genet, 2008. 17(10): p. 1457-64.
163. Cheng, I, Stram, DO, Penney, KL, y col. *Common genetic variation in IGF1 and prostate cancer risk in the Multiethnic Cohort*. J Natl Cancer Inst, 2006. 98(2): p. 123-34.
164. D'Aloisio, AA, Schroeder, JC, North, KE, y col. *IGF-I and IGFBP-3 polymorphisms in relation to circulating levels among African American and Caucasian women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. 18(3): p. 954-66.
165. Cheng, I, DeLellis Henderson, K, Haiman, CA, y col. *Genetic determinants of circulating insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein (BP)-I, and IGFBP-3 levels in a multiethnic population*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(9): p. 3660-6.
166. Patel, AV, Cheng, I, Canzian, F, y col. *IGF-1, IGFBP-1, and IGFBP-3 polymorphisms predict circulating IGF levels but not breast cancer risk: findings from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3)*. PLoS One, 2008. 3(7): p. e2578.
167. Denko, CW, Boja, B y Moskowitz, RW. *Growth promoting peptides in osteoarthritis: insulin, insulin-like growth factor-1, growth hormone*. J Rheumatol, 1990. 17(9): p. 1217-21.
168. Denko, CW, Boja, B y Moskowitz, RW. *Growth factors, insulin-like growth factor-1 and growth hormone, in synovial fluid and serum of patients with rheumatic disorders*. Osteoarthritis Cartilage, 1996. 4(4): p. 245-9.
169. McAlindon, TE, Teale, JD y Dieppe, PA. *Levels of insulin related growth factor 1 in osteoarthritis of the knee*. Ann Rheum Dis, 1993. 52(3): p. 229-31.
170. Lloyd, ME, Hart, DJ, Nandra, D, y col. *Relation between insulin-like growth factor-I concentrations, osteoarthritis, bone density, and fractures in the general population: the Chingford study*. Ann Rheum Dis, 1996. 55(12): p. 870-4.
171. de Vos, P, Hoogmoed, CG y Busscher, HJ. *Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells*. J Biomed Mater Res, 2002. 60(2): p. 252-9.
172. Shoichet, MS y Rein, DH. *In vivo biostability of a polymeric hollow fibre membrane for cell encapsulation*. Biomaterials, 1996. 17(3): p. 285-90.
173. Wu, TJ, Huang, HH, Hsu, YM, y col. *A novel method of encapsulating and cultivating adherent mammalian cells within collagen microcarriers*. Biotechnol Bioeng, 2007. 98(3): p. 578-85.
174. Trouche, E, Girod Fullana, S, Mias, C, y col. *Evaluation of alginate microspheres for mesenchymal stem cell engraftment on solid organ*. Cell Transplant. 19(12): p. 1623-33.

175. Croitoru-Lamoury, J, Lamoury, FM, Caristo, M, y col. *Interferon-gamma regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)*. PLoS One. 6(2): p. e14698.
176. Francois, M, Romieu-Mourez, R, Li, M, y col. *Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation*. Mol Ther. 20(1): p. 187-95.
177. Matysiak, M, Stasiolek, M, Orlowski, W, y col. *Stem cells ameliorate EAE via an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mechanism*. J Neuroimmunol, 2008. 193(1-2): p. 12-23.
178. Ryan, JM, Barry, FP, Murphy, JM, y col. *Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection*. J Inflamm (Lond), 2005. 2: p. 8.
179. Gerdoni, E, Gallo, B, Casazza, S, y col. *Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann Neurol, 2007. 61(3): p. 219-27.
180. Xing, Z, Gauldie, J, Cox, G, y col. *IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses*. J Clin Invest, 1998. 101(2): p. 311-20.
181. Djouad, F, Charbonnier, LM, Bouffi, C, y col. *Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism*. Stem Cells, 2007. 25(8): p. 2025-32.
182. Alonzi, T, Fattori, E, Lazzaro, D, y col. *Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis*. J Exp Med, 1998. 187(4): p. 461-8.
183. Yamamoto, M, Yoshizaki, K, Kishimoto, T, y col. *IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis*. J Immunol, 2000. 164(9): p. 4878-82.
184. Vaalamo, M, Leivo, T y Saarialho-Kere, U. *Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing*. Hum Pathol, 1999. 30(7): p. 795-802.
185. Gorelik, L y Flavell, RA. *Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells*. Nat Med, 2001. 7(10): p. 1118-22.
186. Liu, X, Alexander, V, Vijayachandra, K, y col. *Conditional epidermal expression of TGFbeta 1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(16): p. 9139-44.
187. Li, AG, Wang, D, Feng, XH, y col. *Latent TGFbeta1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder*. EMBO J, 2004. 23(8): p. 1770-81.
188. Lu, SL, Reh, D, Li, AG, y col. *Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation*. Cancer Res, 2004. 64(13): p. 4405-10.
189. Angelo, LS y Kurzrock, R. *Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators*. Clin Cancer Res, 2007. 13(10): p. 2825-30.
190. Bastiaansen-Jenniskens, YM, Koevoet, W, De Bart, AC, y col. *TGFbeta affects collagen cross-linking independent of chondrocyte phenotype but strongly depending on physical environment*. Tissue Eng Part A, 2008. 14(6): p. 1059-66.
191. Uitterlinden, EJ, Jahr, H, Koevoet, JL, y col. *Glucosamine reduces anabolic as well as catabolic processes in bovine chondrocytes cultured in alginate*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. 15(11): p. 1267-74.
192. van Susante, JL, Buma, P, van Osch, GJ, y col. *Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels*. Acta Orthop Scand, 1995. 66(6): p. 549-56.
193. Marijnissen, WJ, van Osch, GJ, Aigner, J, y col. *Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM)*. Biomaterials, 2000. 21(6): p. 571-80.
194. Duggal, S, Fronsdaal, KB, Szoke, K, y col. *Phenotype and gene expression of human mesenchymal stem cells in alginate scaffolds*. Tissue Eng Part A, 2009. 15(7): p. 1763-73.
195. Karlsen, TA, Mirtaheri, P, Shahdadfar, A, y col. *Effect of three-dimensional culture and incubator gas concentration on phenotype and differentiation capability of human mesenchymal stem cells*. J Cell Biochem. 112(2): p. 684-93.
196. Borlongan, CV, Skinner, SJ, Geaney, M, y col. *Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke*. Stroke, 2004. 35(9): p. 2206-10.
197. Lohr, M, Hoffmeyer, A, Kroger, J, y col. *Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma*. Lancet, 2001. 357(9268): p. 1591-2.

198. Calafiore, R, Basta, G, Luca, G, y col. *Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases*. Diabetes Care, 2006. 29(1): p. 137-8.
199. Yu, J, Du, KT, Fang, Q, y col. *The use of human mesenchymal stem cells encapsulated in RGD modified alginate microspheres in the repair of myocardial infarction in the rat*. Biomaterials. 31(27): p. 7012-20.
200. Abruzzo, T, Cloft, HJ, Shengelaia, GG, y col. *In vitro effects of transcatheter injection on structure, cell viability, and cell metabolism in fibroblast-impregnated alginate microspheres*. Radiology, 2001. 220(2): p. 428-35.

